



# MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS

## VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canarias, España

2008-2010

### **EFFECTO DE LA *ARTEMIA* ENRIQUECIDA CON DISTINTAS EMULSIONES COMERCIALES SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO ESQUELÉTICO DE LARVAS DEL LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**

Filiz Özcan

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE  
DEFENDIDA PARA LA OBTENCION  
DEL TITULO DE  
MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria a 21 de Mayo de 2010



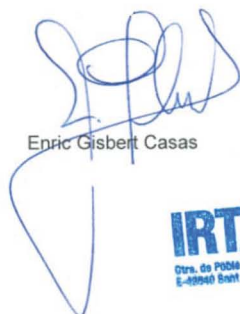
## MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Organizado conjuntamente por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gobierno de Canarias) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), a través del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

### EFECTO DE LA ARTEMIA ENRIQUECIDA CON DISTINTAS EMULSIONES COMERCIALES SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO ESQUELÉTICO DE LARVAS DEL LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)

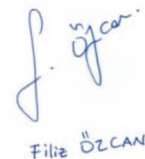
Filiz Özcan

Trabajo realizado en el Centro de Acuicultura del Institut Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA España, bajo la dirección del Dr. Enric Gisbert y presentado como requisito parcial para la obtención del Título oficial de Máster Universitario en Cultivos Marinos otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Diploma de Master of Science en Acuicultura otorgado por el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM).



Enric Gisbert Casas

**IRTA** RECERCA I TECNOLOGIA  
AGROALIMENTÀRIES  
Ctra. de Poble Nou, Km 5,5  
E-42004 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)



Filiz ÖZCAN

Fdo. Dr Enric Gisbert

Fdo. Filiz Ozcan

**Dedicado a**

**A mi madre Feriha**



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero empezar por expresar mis agradecimientos al Dr. Enric Gisbert, director de este trabajo, por su predisposición incondicional en aclararme todas mis dudas, por toda su ayuda y dedicación en la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a las Dr<sup>as</sup> Alicia Estévez y Maria Darias por sus incondicionales ayudas en la realización de este trabajo y su inestimable atención. No menos importante quiero agradecer a la Dr<sup>a</sup> Carmen Hernandez Cruz por su ayuda a la hora de decidirme por el tema de la tesina y por toda ayuda en el Máster.

Quiero expresar mis agradecimientos a Anais Boglino y Ali Skalli, compañeros de trabajo, por sus inestimables ayudas y amistades.

Quiero agradecer a todo el equipo técnico del IRTA por su esencial e importante ayuda en el desarrollo de esta tesina. En particular quiero agradecer a Marta, Magda, Noelia, Sandra, Miriam, Isolda, Xavi y Rafael por su ayuda en los cultivos auxiliares, en el cultivo larvario, en los muestreos y en la manutención de los tanques. Quiero volver a agradecer a Noelia por su inestimable ayuda en la extracción de los lípidos.

Quiero agradecer al Dr. Mahmut Ali Gokce, al Dr. Oguz Tasbozan y al Investigador Sefik Surhan Tabakoglu, todos ellos profesores de la asignatura de acuicultura en la Facultad de Ciencias de Turquía, por sus palabras de ánimo y orientación en aquel momento de decisión, no se me olvidaran sus palabras.

## **LISTA DE CONTENIDOS**

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>Pág. 1</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>Pág. 7</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>Pág. 9</b>
<b>2. INTRODUCCION.....</b>	<b>Pág. 12</b>
<b>2.1. Definición de la Acuicultura.....</b>	<b>Pág. 13</b>
<b>2.2. Desarrollo de la Acuicultura.....</b>	<b>Pág. 13</b>
<b>2.3. El estado mundial de la Acuicultura.....</b>	<b>Pág. 15</b>
<b>2.4. La Acuicultura España.....</b>	<b>Pág. 19</b>
<b>2.5. .Generalidades sobre el lenguado senegalés .....</b>	<b>Pág. 22</b>
<b>2.5.1. Taxanomia y Distribución Geográfica.....</b>	<b>Pág. 22</b>
<b>2.5.2. Morfología Externa.....</b>	<b>Pág. 24</b>
<b>2.5.3. Biología.....</b>	<b>Pág. 25</b>
<b>2.6. Situación del lenguado senegalés en la investigación.....</b>	<b>Pág. 27</b>
<b>2.7. Producción de lenguado senegalés en España.....</b>	<b>Pág. 28</b>
<b>2.8. .Métodos para la obtención de larvas de lenguado senegalés.....</b>	<b>Pág. 30</b>
<b>2.8.1. Incubación de los huevos.....</b>	<b>Pág. 30</b>
<b>2.8.2. Cultivo larvario.....</b>	<b>Pág. 31</b>
<b>2.8.3. Alimentación larvaria.....</b>	<b>Pág. 31</b>
<b>2.9. Función de ácidos grasos esenciales (AGA)... ..</b>	<b>Pág. 35</b>
<b>2.9.1. Los ácidos grasos en alimentación de peces marinos.....</b>	<b>Pág. 36</b>
<b>2.9.2. Los requisitos esenciales de los ácidos grasos en peces marinos. Pág.</b>	<b>38</b>
<b>2.9.3. La utilización de los ácidos grasos en lenguado senegalés.....</b>	<b>Pág. 40</b>
<b>2.9.4. Efecto de los ácidos grasos en desarrollo del esquelético en peces marinos.....</b>	<b>Pág. 46</b>
<b>2.9.5. Sistema digestivo en lenguado senegales.....</b>	<b>Pág. 46</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>Pág. 51</b>



<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>Pág. 53</b>
<b>4.1. Diseño experimental.....</b>	<b>Pág. 55</b>
<b>4.2. Producción y enriquecimiento de presas vivas.....</b>	<b>Pág. 56</b>
<b>4.2.1. Enriquecimiento de Rotíferos.....</b>	<b>Pág. 56</b>
<b>4.2.2. Enriquecimiento de <i>Artemia</i>.....</b>	<b>Pág. 57</b>
<b>4.3. Cultivo larvario.....</b>	<b>Pág. 59</b>
<b>4.3.1. Condiciones físico-químicas durante el cultivo.....</b>	<b>Pág. 62</b>
<b>4.3.2. Protocolo de alimentación larvaria.....</b>	<b>Pág. 62</b>
<b>4.3.3. Muestreos y análisis.....</b>	<b>Pág. 64</b>
<b>4.3.3.1. Longitud y peso seco .....</b>	<b>Pág. 64</b>
<b>4.3.3.2. Supervivencia.....</b>	<b>Pág. 66</b>
<b>4.3.3.3. Grado de migración del ojo (Metamorfosis).....</b>	<b>Pág. 66</b>
<b>4.3.3.4. Bioquímica.....</b>	<b>Pág. 67</b>
<b>4.3.3.4.1. Extracción de lípidos totales.....</b>	<b>Pág. 67</b>
<b>4.3.3.4.2. Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.....</b>	<b>Pág. 68</b>
<b>4.3.3.5. Estudio de la deformaciones esqueléticos.....</b>	<b>Pág. 69</b>
<b>4.3.3.6. Análisis de las enzimas digestivas.....</b>	<b>Pág. 73</b>
<b>4.3.3.7. Analisis estadístico.....</b>	<b>Pág. 75</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>Pág. 76</b>
<b>5.1. Composición lipídica de las presas vivas.....</b>	<b>Pág. 77</b>
<b>5.2. Efecto de la dieta sobre las larvas lenguado.....</b>	<b>Pág. 79</b>
<b>5.2.1. Crecimiento.....</b>	<b>Pág. 79</b>
<b>5.2.2. Supervivencia.....</b>	<b>Pág. 80</b>
<b>5.2.3. Efectos de la dieta sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de las larvas .....</b>	<b>Pág. 81</b>

5.2.4. Metamorfosis.....	Pág. 84
5.2.5. Desarrollo y madurez del sistema digestivo.....	Pág. 87
5.2.5.1. Enzimas pancreáticas.....	Pág. 87
5.2.5.1.1 Amilasa.....	Pág. 87
5.2.5.1.2 Tripsina.....	Pág. 88
5.2.5.1.3 Lipasa.....	Pág. 89
5.2.5.2. Enzimas intestinales citosólicas.....	Pág. 90
5.2.5.2.1. Luecina alanina peptidasa.....	Pág. 90
5.2.5.3. Enzimas intestinales del borde cepillo.....	Pág. 91
5.2.5.3.1 Fosfatasa alcalina.....	Pág. 91
5.2.5.3.2. Aminopeptidasa.....	Pág. 92
5.2.6. Deformaciones esqueléticas.....	Pág. 93
5.2.6.1. Malformaciones totales (38 dph).....	Pág. 93
5.2.6.2. Columna vertebral.....	Pág. 94
5.2.6.3. Complejo caudal.....	Pág. 101
6. DISCUSIÓN.....	Pág. 106
6.1. Composición en ácidos grasos de la <i>Artemia</i> enriquecida.....	Pág.107
6.2. Crecimiento y Supervivencia.....	Pág. 109
6.3. Metamorfosis.....	Pág. 118
6.4. Maduración del Sistema Digestivo.....	Pág. 119
6.5. Malformaciones Esqueléticas.....	Pág. 127
7. CONCLUSIONES.....	Pág. 129
8. REFERENCIAS.....	Pág. 133

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Fig.2.2.1.</b> Producción acuicultura mundial principales grupos de especies en 2006.....	Pág. 14
<b>Fig.2.3.1.</b> Producción de acuicultura por región en 2006.....	Pág. 15
<b>Fig.2.3.2.</b> Los principales países productores de dorada en Europa.....	Pág. 17
<b>Fig.2.3.3.</b> Los principales países productores de lubina en Europa.....	Pág. 18
<b>Fig.2.4.1.</b> Distribución porcentual de dorada + lubina en 2008 por comunidades autónomas.....	Pág. 20
<b>Fig.2.5.1.</b> Distribución de <i>Solea senegalensis</i> .....	Pág. 24
<b>Fig.2.5.2.</b> Ejemplar de lenguado senegalés adulto.....	Pág. 25
<b>Fig.2.7.1.</b> Producción de lenguado en España entre de los años 2000 y 2008.....	Pág. 29
<b>Fig.2.7.2</b> Principal comunidades autónomas de producción de <i>lenguado</i> .....	Pág. 29
<b>Fig.2.8.3.1.</b> A; Rotífero ( <i>Brachionus plicatilis</i> ) B; Adultos de Artemia ( <i>Artemia salina</i> ) Nauplio de <i>Artemia salina</i> que tiene enriquecedor de Easy selco.....	Pág. 32
<b>Fig.2.8.3.2.</b> Esquema alimentario estándar para larvas de lenguado senegalés (T=19° C) dpe.....	Pág. 33
<b>Fig.2.8.3.3.</b> Estadios de desarrollo de las larvas del lenguado senegalés ( <i>Solea senegalensis</i> ).....	Pág. 34
<b>Fig. 2.9.2.1.</b> Ruta de síntesis los ácidos grasos políinsaturados.....	Pág. 37
<b>Fig. 4.1</b> Vista Aérea de Las Instalaciones del Sant Carles De La Rápita– Institut Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, SCR-IRTA.....	Pág. 54
<b>Fig.4.2.1.1.</b> Sala de cultivos auxiliares del IRTA. A la izquierda cultivo de micro algas y a la derecha cultivo de rotíferos y Artemia.....	Pág. 56
<b>Fig. 4.2.2.1.</b> Imagen de los tanques que usaron para enriquecer los nauplios de <i>Artemia</i> .....	Pág. 58

<b>Fig.4.3.1</b> Sala de cultivo larvario de las instalaciones de la hatchery de el IRTA-SCR.....	Pág. 59
<b>Fig.4.3.2</b> .Tanque de la sala de larvario provisto de entrada de agua, desagüe central, malla y aireador.....	Pág. 60
<b>Fig.4.3.3.</b> Cubitainers donde los huevos del lenguado fueron transportados hasta las instalaciones del IRTA.....	Pág. 61
<b>Fig. 4.3.2.1.</b> El protocolo de la alimentación utilizada, para las larvas del lenguado senegalés.....	Pág. 63
<b>Fig 4.3.3.1.1. Imagen de</b> los cubreobjetos usados para calcular el peso seco de las larvas.....	Pág. 65
<b>Fig 4.3.3.3.1.</b> Posición de los ojos durante las distintas fases de la metamorfosis de <i>S.senegalensis</i> .....	Pág. 66
<b>Fig. 4.3.3.4.2.1.</b> Imagen del Cromatografía de Usado para la cuantificación de los ácido grasos.....	Pág. 69
<b>Fig. 4.3.3.5.1.</b> Un microscopio binocular (Nikon SMZ 800) y un analizador de imágenes (Análisis, SIS GMBH, Alemania).....	Pág. 71
<b>Fig. 4.3.3.5.2.</b> Representación esquemática del desarrollo o del complejo caudal en lenguado senegalés.....	Pág. 72
<b>Fig.4.3.3.6.2.</b> Espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-Tek) utilizado para la cuantificación de las enzimas pancreaticas y intestinales.....	Pág. 75
<b>Fig. 5.2.1.1.</b> Efecto de las distintas emulsiones en el crecimiento en peso seco de las larvas del lenguado senegalés.....	Pág. 79
<b>Fig. 5.2.1.2.</b> Efecto de las distintas emulsiones en el crecimiento en talla (longitud estándar) de las larvas del lenguado senegalés.....	Pág. 80

- Fig. 5.2.2.1.** Efecto de las distintas emulsiones sobre la supervivencia las larvas del lenguado senegalés.....Pág. 81
- Fig.5.2.4.1.** Índice de migracion del ojo durante el proceso de metamorfosis en las larvas según las distintas emulsiones 10 dpe; 15 dpe; 22 dpe; 31 dpe y 38 dpe estadios de metamorfosis.....Pág. 84
- Fig. 5.2.5.1.1.1** Evolución de la actividad de la amilasa (U/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.....Pág. 87
- Fig. 5.2.5.1.2.1.** Evolución de la actividad de la enzima Tripsina (mU/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.....Pág. 88
- Fig. 5.2.5.1.3.1.** Evolución de la actividad de la enzimática lipasa (U/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.....Pág. 89
- Fig. 5.2.5.2.1.** Evolución de la actividad de la enzimática leucina alanina paptidasa (U/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés 38 dpe.....Pág. 90
- Fig.5.2.5.3.1.1** Evolución de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (mU/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.....Pág. 91
- Fig. 5.2.5.2.2.1** Evolución de la actividad de la enzima aminopeptidasa (mU/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.....Pág. 92

**Fig.5.2.6.1.1** Efecto de las distintas emulsiones sobre la incidencia de las deformaciones esqueléticas en larvas de lenguado alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.....Pág. 93

**Fig .5.2.6.2.1.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas totales en cuerpos vertebrales.....Pág. 94

**Fig. 5.2.6.2.2.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas severas en cuerpos vertebrales.....Pág. 95

**Fig. 5.2.6.2.3.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas ligeras en cuerpos vertebrales.....Pág. 95

**Fig. 5.2.6.2.4.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el número de vértebras del esqueleto de las larvas del lenguado.....Pág. 96

**Fig. 5.2.6.2.5.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con espinas neurales (NS) deformes.....Pág. 97

**Fig. 5.2.6.2.6.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con espinas hemales (HS) deformes.....Pág. 97

**Fig. 5.2.6.2.7.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con fusionas vertebrales.....Pág. 98

**Fig. 5.2.6.2.8.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con compresión vertebral.....Pág. 99

**Fig. 5.2.6.2.9.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con escoliosis.....Pág. 99

**Fig. 5.2.6.2.1.0.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con anomalías vertebrales.....Pág. 100

**Fig. 5.2.6.2.1.1.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con torsión vertebral.....Pág. 101

**Fig.5.2.6.3.1** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con deformaciones en el complejo caudal.....Pág. 102

**Fig.5.2.6.3.2.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con malformaciones en las espinas hemales y neurales modificadas.....Pág. 103

**Fig.5.2.6.3.3.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con malformaciones de los hipurales, parahipural y epural que forman el complejo caudal.....Pág. 103



## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 2.5.1.** Posición sistemática de *Solea senegalensis*.....Pág. 23

**Tabla 4.1.1.** La composición de las emulsiones que usaron para enriquecer

*Artemia*.....Pág. 55

**Tabla 5.1.1** Resultados del análisis de bioquímica de lípidos y ácidos grasos de la

*Artemia* enriquecida.....Pág. 78

**Tabla 5.2.3.1** Composición en porcentaje de ácidos grasos totales de las larvas de

lenguado senegalés al final del experimento.....Pág. 83

**Tabla 5.2.6.** Efecto de las distintas emulsiones sobre de crecimiento y desarrollo

esquelético larvas de lenguado en la frecuencia de individuos con la deformación

esquelética.....Pág. 104

## **1. RESUMEN**

Las malformaciones esqueléticas y problemas pigmentarios son uno de los mayores problemas de la producción intensiva de juveniles de peces marinos en el sector de la acuicultura, al reducir la calidad del ejemplar, pues afectan su morfología, apariencia externa, crecimiento, y supervivencia. Tales problemas en el desarrollo representan una importante pérdida económica para el acuicultor y una reducción considerable en la imagen de calidad del producto final si éste es comercializado. Las deformidades esqueléticas y problemas de despigmentación pueden ser causados por varios motivos, pero la causa nutricional es una de las más importantes. A pesar de la gran importancia económica que este problema representa para el acuicultor, se ha prestado poca atención a los mecanismos que controlan dichos procesos y a su regulación nutricional. En este sentido, diversos estudios han demostrado que existe una marcada relación entre la nutrición de la larva durante el periodo comprendido entre el inicio de la alimentación exógena y de la metamorfosis con la aparición de malformaciones esqueléticas y problemas de mala pigmentación en ejemplares juveniles de teleósteos marinos. Así, diversos autores han demostrado el efecto de determinados nutrientes (ácido retinoico, vitamina D, ácidos grasos poliinsaturados, hidrolizados de proteína, etc.) sobre la diferenciación y desarrollo del eje antero-posterior de la larva, y la aparición de deformaciones esqueléticas y problemas pigmentarios.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de distintos niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) sobre el desarrollo temprano de larvas de lenguado, y en especial su efecto sobre el crecimiento, tasa de metamorfosis, supervivencia e incidencia de deformaciones esqueléticas. Al final de experimento, día 38, se observaron diferencias significativas en la frecuencia de individuos con deformaciones esqueléticas, aumentando esta frecuencia, gradual y

significativamente, efecto de la artemia enriquecida con distintas emulsiones comerciales sobre el crecimiento y desarrollo esquelético de larvas del lenguado senegalés (*solea senegalensis* kaup, 1858) .

Efecto de la artemia enriquecida con distintas emulsiones comerciales sobre el crecimiento en peso, al estado de desarrollo del aparato digestivo, y al proceso de metamorfosis, si bien tienen un marcado efecto sobre la incidencia y severidad de distintas deformaciones esqueléticas que se han detectado. A partir del análisis ponderado de los distintos parámetros analizados en el presente estudio es recomendable alimentar las larvas de lenguado con *Artemia* enriquecida con AquaGrow Gold (Advanced BioNutrition), desaconsejándose enriquecedores del tipo Easy Selco (INVE) o similares.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2.1. Definición de la acuicultura

La acuicultura se define, según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), como el “cultivo de organismos acuáticos, propiedad de una persona física o jurídica, situados en áreas de tierra o costeras mediante técnicas que permiten aumentar la producción”.

El Diccionario de la Real Academia Española define la "Acuicultura" como "Técnicas de cultivo en el agua de especies vegetales y animales", mientras que en la Ley de Cultivos Marinos (23/1984 de 25 de Junio) se define como "La realización de las acciones y labores apropiadas para la reproducción o crecimiento de alguna o varias especies de la fauna y flora marinas o asociadas a ellas" (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, (MAPA) 1984).

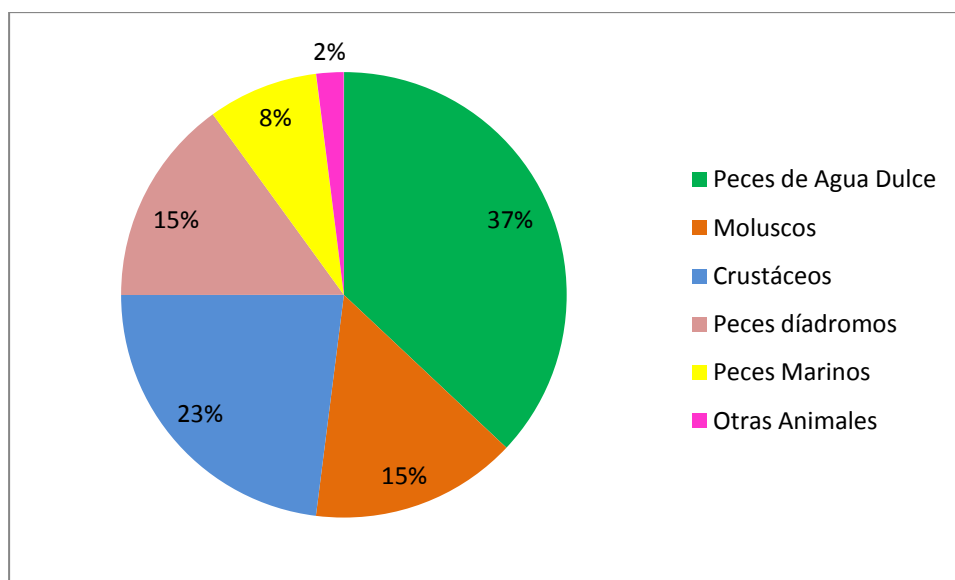
## 2.2. Desarrollo de la acuicultura

La investigación en acuicultura empezó hace menos de 100 años, aunque desde hace siglos el cultivo de peces tradicional ha formado parte de la vida rural del hombre. La forma más primitiva de acuicultura que se conoce es el mantenimiento y cultivo de carpas (*Cyprinus carpio*) en estanques naturales de agua dulce en China (Ling, 1977). También se tienen indicios de que en el año 2.500 a.c. los egipcios ya cultivaban tilapia (*Tilapia sp.*).

En la actualidad, continúa creciendo la contribución de la acuicultura al suministro mundial de peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos. Este incremento ya fue observado con un aumento del 3,9 % de la producción total en peso en 1970 al 27,1 % en 2000 y al 32,4 % en 2004. Este crecimiento sigue siendo más

rápido que el logrado en cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal. En todo el mundo, la tasa media de crecimiento de este sector ha sido del 8,8 % al año desde 1970, mientras que, durante el mismo período, la pesca de captura ha crecido solamente a razón del 1,2 % y los sistemas de producción de carne de cría en tierra, un 2,8 %.

El aumento de la producción de la acuicultura ha sido muy superior al crecimiento demográfico, puesto que su suministro medio anual per cápita ha aumentado de 0,7 kg en 1970 a 7,1 kg en 2004, lo que representa un incremento anual medio del 7,1 % (FAO, El Estado de Mundial De La Pesca y La Acuicultura, 2006). 7,8 kg en 2006, lo cual supone un crecimiento medio anual del 7,0 %. La acuicultura proporcionó el 47 % del suministro mundial de pescado para alimentación en 2006. (FAO, 2008).

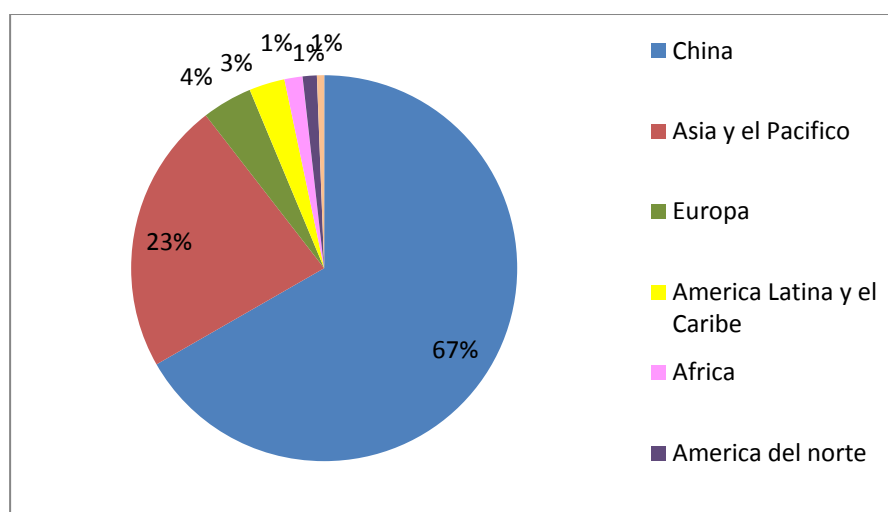


**Fig.2.2.1** Producción acuícola mundial principales grupos de especies en 2006 (FAO, 2008).



### 2.3. El estado mundial de la acuicultura

Hoy en día, China sigue siendo el mayor productor de pescado del mundo. En China, el 90 % de la producción de pescado para alimentación proviene de la acuicultura. Esto indica que la producción acuícola del resto del mundo asciende al 24 % del suministro de pescado destinado a la alimentación. En 2006, China contribuyó en un 67 % al suministro mundial de animales acuáticos cultivados y en un 72 % al de plantas acuáticas. (FAO, 2008).



**Fig.2.3.1.** Producción de acuicultura por región en 2006 (FAO, 2008).

El consumo de pescado ha sufrido cambios importantes en los últimos cuatro decenios. Se estima que el consumo de pescado per cápita mundial ha aumentado de manera continua desde una media de 9,9 kg en la década de 1960 hasta los 11,5 kg en la década de 1970, 12,5 kg en la década de 1980, 14,4 kg en la década de 1990 y alcanzó los 16,4 kg en 2005. No obstante, este incremento no ha sido uniforme en todas las regiones. En los últimos tres decenios, el suministro de pescado per cápita ha permanecido prácticamente estático en el África subsahariana. Por el contrario, ha

aumentado de forma drástica en Asia oriental (principalmente en China) y en la región del Cercano Oriente y África del Norte. China ha representado la mayor parte del crecimiento mundial; la proporción estimada de la producción mundial de pescado que aportó este país aumentó del 21 % en 1994 al 35 % en 2005, cuando el suministro per cápita de pescado en China era de unos 26,1 kg.

Si se excluye a China, el abastecimiento per cápita de pescado es de unos 14,0 kg, una cifra ligeramente superior a los valores medios de mediados de la década de 1990 e inferior a los niveles máximos registrados en la de 1980 (14,6 kg). Los datos preliminares para 2006 indican un pequeño incremento del suministro de pescado per cápita mundial hasta los 16,7 kg.

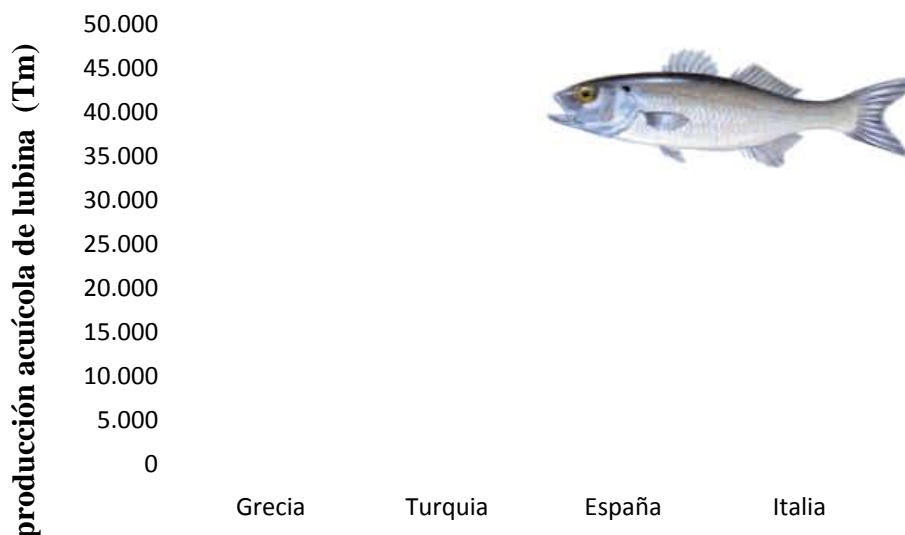
La dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) son las más importantes especies de peces marinos de crianza producidas en los países europeos meridionales y dos de las más importantes a nivel de consumo. Prácticamente todos los países ribereños del Mediterráneo producen dorada y lubina mediante acuicultura coexistiendo en muchas ocasiones ambas especies en las mismas instalaciones, se realiza en la vertiente atlántica europea, siendo más reducido el número de países productores.

La producción acuícola total de dorada (*Sparus aurata*) en Europa y el resto del mundo en 2008 ha sido de 157.630 Tm, tan solo un 4,2% superior a la cifra de 2007, que es una tasa de crecimiento 4% veces inferior a la de años anteriores. La previsión de producción para 2009 apunta a la primera caída real de las producciones desde la crisis de 2000-2003, hasta 145.800 Tm (-7,4%). Los principales países productores de dorada son Grecia (81.000 Tm, el 51,4%), Turquía (30.000 Tm, el 19,0 %), España (23.939 Tm, el 15,2%) e Italia (9.600 Tm, el 6,1%) (APROMAR, 2009).



**Fig.2.3.2.** Los principales países productores de dorada en Europa.

La producción acuícola total de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en Europa y el resto del mundo en 2008 fue de 117.530 toneladas, un 10,9 % superior a la cifra de 2007. La previsión de producción para 2009 apunta a las 116.520 Tm (+7,6%). Los principales países productores de lubina son Grecia (44.000 Tm, el 37,4 %), Turquía (44.000 Tm, el 37,4%), España (9.840, el 8,4 %) e Italia (9.800, el 8,3%). (APROMAR, 2009).



**Fig.2.3.3.** Los principales países productores de lubina en Europa

Con una historia relativamente reciente, el cultivo de peces marinos en Europa se ha caracterizado por demandar tempranamente una diversificación de especies susceptibles de ser producidas industrialmente. Fruto de ello, se emprendieron de forma generalizada numerosas actuaciones dirigidas a conocer las posibilidades de cultivo de un notablemente elevado número de peces. Durante los últimos tres lustros, son más de treinta las especies de peces que han sido objeto de estudio en el área mediterránea (Divanach, 2003).

Actualmente, sin embargo, la producción de peces marinos está basada en unas pocas especies como la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Ello comporta situaciones de exceso de oferta, precios bajos y mercados saturados. Es por eso que la diversificación mediante la producción de otras especies de peces es un objetivo primordial en la acuicultura actual con el fin de aumentar las oportunidades de mercado.

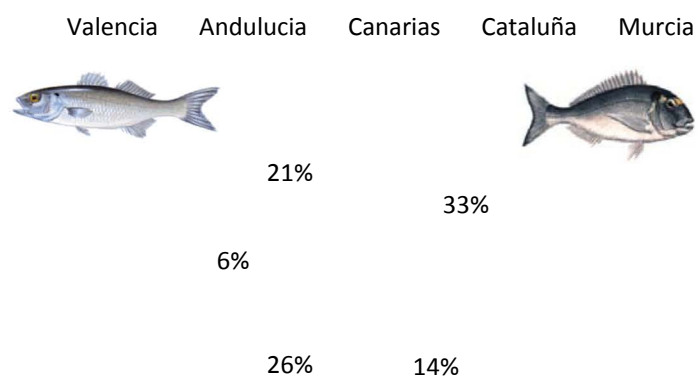
En este sentido, el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) se puede considerar de momento como una especie con una complejidad tecnológica media, pero con un buen potencial de mercado. Cabe preguntarse entonces porqué la acuicultura del lenguado senegalés no se ha desarrollado en un nivel superior al que sería de esperar en la actualidad, atendiendo al espacio de tiempo transcurrido desde que se iniciaron estudios relacionados con la acuicultura de esta especie. En esta revisión realiza un análisis sobre la evolución de la acuicultura del lenguado, y los logros conseguidos hasta el presente, tratando además de identificar actuaciones pasadas que expliquen la situación presente.

### **2.4. La Acuicultura España**

La acuicultura en España comenzó en los años 70, en pequeñas empresas familiares las cuales trabajaban básicamente con mejillón y trucha. Posteriormente, en los noventa, se incorporó el cultivo del rodaballo en el Norte de España y de dorada y lubina en el sur, levante y Canarias, incorporando nuevas tecnologías a nivel industrial, científico y empresarial que mejoraron el cultivo piscícola de cada especie en los diferentes niveles biológicos: reproducción, crecimiento larvario, destete y engorde, así como se profundizó en conocimientos de patología y biología del medio. Más tarde aparecieron nuevas especies en la acuicultura española, como la anguila (*Anguilla anguilla*) en Levante, el atún rojo (*Thunnus thynnus*) en Murcia, la carpa (*Cyprinus carpio*), en Baleares, la tenca (*Tinca tinca*) en Extremadura, el esturión (*Acipenser sturio*) en Cuenca del Guadalquivir, o la corvina (*Argyrosomus regius*) en Levante. Según la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR, 2009) la producción española de acuicultura continental y marina en el año 2005, supuso el 3% de la producción mundial y el 25% de la europea. Actualmente España se encuentra en el puesto 11º del ranking mundial de productores (datos aportados por el

Fondo de Regulación y Organización del Mercado de los Productos de la Pesca y Cultivos Marinos, FROM, adscrito al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, <http://from.mapa.es/>) siendo las especies principales la lubina, la dorada, el rodaballo y los túnidos.

Dadas las similitudes en los requerimientos productivos y de las condiciones de comercialización de la dorada y la lubina estas dos especies son alternativas de producción en las mismas instalaciones. Por este motivo es ilustrativo considerar sus datos de producción conjuntamente. La producción acuícola conjunta de dorada y lubina en España en 2008 ha sido de 33.770 Tm (un 3,0% mayor que en 2007). Las previsiones para 2009 indican que se alcanzarán 35.200 Tm, un 4,2% superior. Las producciones de 2008 suponen el 12,3% de la producción mediterránea (y mundial) de estas dos especies consideradas conjuntamente. El año anterior (2007) esa representatividad había sido del 12,8%.



**Fig.2.4.1.** Distribución porcentual de dorada + lubina en 2008 por comunidades autónomas.

Al igual que en el caso de la dorada y de la lubina, la cantidad de rodaballo silvestre que es capturada por la flota española es cada vez más escasa y testimonial en los mercados (45 Tm en 2007). Si bien es cierto que las importaciones de rodaballo de la pesca extractiva procedentes de Europa (principalmente desde los Países Bajos) son aun relevantes. La producción acuícola de rodaballo en España en 2008 ha sido de 7.870 Tm, un 29,4% superior a la de 2007. Las previsiones para 2009 señalan una estabilización temporal de la producción en el entorno de las 7.760 Tm ( Apromar, 2009).

La producción de anguila (*Anguilla anguilla*) es una actividad tradicional en España, con diversos niveles de intensificación del cultivo. La producción anual se mantiene en varios cientos de toneladas, 470 Tm en 2008, distribuidas entre la Comunidad Valenciana, Andalucía, Cataluña y el País Vasco. Apromar, 2009 se espera un incremento de la producción a 510 Tm. El aprovisionamiento de angulas silvestres (alevines de anguila) continúa siendo un cuello de botella para la producción de esta especie y podría verse dificultada por nuevas normas europeas para la conservación de esta especie (Apromar, 2009).

La corvina (*Argyrosomus regius*) va camino de ser la cuarta especie importante de la acuicultura marina de peces en España. Su producción a gran escala es ya un hecho, siendo la comercialización su principal freno, ya que no es una especie conocida de forma general en los mercados. Su producción en 2008 ascendió a 1.300 Tm, y probablemente superará las 2.150 Tm en 2009. La producción de alevines de esta especie fue de 500.000 unidades en criaderos en España, existiendo también importación de individuos desde otros Estados de la UE (Apromar, 2009).

La producción de besugo (*Pagellus bogaraveo*) está localizada en Galicia y supuso 200 Tm en 2008, previéndose 190 para 2009. Se produjeron 494.000 alevines de esta especie. El langostino (*Penaeus japonicus*) se produce en pequeñas cantidades (40 Tm) en Andalucía, pero al poder comercializarse en vivo ocupa un interesante nicho de mercado. De este crustáceo se produjeron 1 millón de postlarvas. Consumo muy reducido y poca posibilidad de expansión de su cultivo debido a competencia con mercados asiáticos y sudamericanos. Ver página 21-23 producciones de *lenguado senegalés* en España.

## **2.5. Generalidades sobre el lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**

### **2.5.1 Taxonomía y distribución geográfica**

El lenguado senegalés pertenece al orden Pleonectiformes (**Tabla 2.5.1.**), que engloba a los comúnmente denominados “peces planos” y es el único orden dentro de los vertebrados cuyos individuos presentan una simetría bilateral alterada. Dentro de este orden se incluye la familia de los soleidos, cuyos integrantes se caracterizan por presentar un hocico redondeado y la boca en posición ínfera. La familia de los soleidos (Soleidae) está compuesta por 7 géneros y 14 especies.



**Tabla 2.5.1.** Posición sistemática de *Solea senegalensis*

---

**Superclase:** GNATOSTOMADOS (*Gnathosmata*)

**Clase:** Osteictios (*Osteichthyes*)

**Subclase:** Actinopterigidos (*Actinopterygii*)

**Infraclase:** Actinopteros (*Actinopteri*)

**Superdivisión:** Neopterigios (*Neopterigii*)

**División:** Halecóstomos (*Halecostomi*)

**Subdivisión:** Teleósteos (*Teleostei*)

**Orden:** Pleuronectiformes (*Pleuronectiformes*)

**Familia:** Soleidos (*Soleida*)

**Género:** *Solea*

**Especie:** *Solea senegalensis*

---

El lenguado senegalés pertenece al género *Solea*, dentro del cual se engloban 10 especies. *Solea aegyptiaca*, *S. bleekeri*, *S. elongata*, *S. fulvomarginata*, *S. kleinii*, *S. humilis*, *S. senegalensis*, *S. solea* y *S. stanaland* (Fishbase, 2007).

Anteriormente, esta especie se denominaba como *Solea melanochira* (Borja, 1920) y recupera su identidad como *S. senegalensis* en posteriores trabajos se encuentra en la costa Norte de Túnez (Goucha y Ktari, 1981), en el lago de Ichkeul (Chaouachi y

Hassine, 1998), en el Golfo de Lyon (Quignard et al., 1986) y en el Mediterráneo (Rodríguez y Rodríguez, 1980)

Actualmente se considera que el lenguado senegalés se distribuye en el Océano Atlántico a lo largo de costa este, desde Senegal hasta la Rochelle (Francia), y en el Mar Mediterráneo, a lo largo las costas de España, Italia, Grecia y norte de Africa **Fig.2.5.1.**



**Fig. 2.5.1.** Distribución de *Solea senegalensis* (Porta, 2006).

### 2.5.2. Morfología externa

El lenguado senegalés es un pez plano de cuerpo ovalado y asimétrico con ambos ojos sobre el costado derecho. Hocico redondo y boca pequeña de forma semicircular que alcanza el borde inferior del ojo derecho. Aletas dorsal y anal de base muy amplia claramente separadas de la aleta caudal. Final de las aletas dorsal y anal unidas por una fina membrana en la base de la aleta caudal. La aleta pectoral en el lado ocular y presenta una pigmentación de color negro en la parte media y distal de su membrana (Ben-Tuvia 1990). Línea lateral recta formando un pequeño arco en la zona supratemporal ya abundante mucosidad corporal, presentando varias tonalidades de

pigmentación de marrón muy claro a más oscuro pudiendo presentar pequeñas manchas concéntricas de diferente tonalidad. Los ejemplares adultos suelen medir 45 cm en el Mediterráneo y hasta 60 cm en el Atlántico (Abellan y Basurco 1999).



**Fig.2.5.2.** Ejemplar de lenguado senegalés adulto.

### 2.5.3. Biología

El lenguado es una especie marina bentónica, le gusta vivir sobre fondos arenosos y camuflarse en ellos, llegando a una profundidad de hasta 100 metros. Se alimenta de organismos invertebrados bentónicos como anélidos (principalmente, *Hediste deversicolor*), larvas de poliquetos y moluscos bivalvos o pequeños crustáceos (tanaideaceos, isópodos, anfípodos y decápodos) como *Corophium spp.* (Abellan y Basurco, 1999; Cabral, 2000; Sá et al., 2003; Braber y De Groot, 1973) y sobretodo se alimenta por la noche (De Groot, 1971).

Se trata de un pez gonocórico (Dinis et al. 1999), desprovisto de caracteres sexuales secundarios aunque en la época de reproducción las hembras experimentan un

aumento considerable de los ovarios, y un cambio de color en la zona ventral visibles a simple vista.

Presenta dos épocas de puesta: la más importante desde marzo hasta junio, y la segunda, de menor importancia, de septiembre/octubre hasta noviembre. Es en los meses de octubre a junio cuando las hembras experimentan un desarrollo mayor de los ovarios, sufriendo una regresión parcial de las gónadas en los meses de verano. Los machos producen espermatozoides durante todo el año, aunque la máxima proporción ocurre en primavera y disminuye en los meses de verano (García-López et al., 2006 a,b).

La reproducción tiene lugar a temperaturas entre 13 °C y 23 °C, aunque pueden darse altas fecundidades entre 15 °C y 21 °C (Anguis y Cañavate, 2005). El periodo de puesta suele variar entre 4 y 6 meses, declinando la talla de los huevos a lo largo de dicho periodo (Dinis, 1999). Las puestas son tanto mejores cuanto más bajas son las temperaturas durante el invierno (por debajo de 10 °C), y durante la época de puesta, éstas parecen ocurrir entre 17 °C y 20 °C (Dinis et al., 1999), no hay puestas por debajo de 16 °C). La producción media de huevos es de 29.600±21.600 huevos día/Kg, y la mayoría de los huevos (65-73%) son producidos a los tres días después de un aumento de 2,5 °C de la temperatura. La tasa de fertilización puede ser muy variable (45-63%), mientras que la tasa de eclosión, la cual ocurre aproximadamente a las 42 h desde la fertilización a 19 °C, es del 70-57% (Anguis y Cañavate, 2005).

Las larvas eclosionan con una longitud media de 2,4±0,1 mm, con pequeñas variaciones según stock y tamaño del huevo (Dinis, 1986 citado en Dinis et al., 1999). La alimentación de las larvas del lenguado senegalés ha sido ampliamente documentada (Dinis et al., 1999). Inicialmente son alimentadas con rotífero durante los primeros 3 a 9 días después de la eclosión (DPE), seguidos de *Artemia nauplii*, o directamente de *Artemia* desde el primer día. Estas dietas vivas son pobres en ácidos grasos esenciales,

según documentó Sargent et al., (1999) por lo cual son enriquecidas con algas, aceites, o otras emulsiones ricas en nutrientes esenciales. La metamorfosis suele comenzar sobre el día 11 DPE, con la migración del ojo, y suele estar completada sobre el día 19 DPE, con una longitud media de  $7,3\pm 0,8$  mm (Dinis, 1999). El momento del destete, o aclimatación a piensos comerciales de pequeño tamaño, varía entre autores, a partir del día 31 DPE (Dinis et al., 1992); a partir del día 43 DPE (Cañavate y Fernandez-Díaz, 1999); o incluso a partir de los 6 meses (Flos et al., 1995), dependiendo del balance deseado entre coste y supervivencia. Sin embargo, una alimentación inadecuada durante el estado larvario y/o a lo largo de la metamorfosis, provoca graves problemas de mortalidades, malformaciones, mal pigmentaciones y patologías (Soares et al., 2001; Padrós et al., 2003; Zarza et al., 2003), y aún hoy en día, este problema es una grave limitación para el cultivo larvario a gran escala.

### **2.6. Situación del lenguado senegalés en la investigación y la acuicultura**

El lenguado fue una de las primeras especies marinas que, ya a finales del siglo XIX y principios del XX, se consideraron aptas para la piscicultura con fines económicos, juntamente con el rodaballo y la lubina, de acuerdo con la cita de Personle- Ruyet (1986). Parece ser que a pesar de esta consideración, según el mismo autor, el cultivo de lenguado cayó en el olvido hasta finales de los 60 o inicios de los 70, en que la especie recuperó interés por parte de los investigadores.

A partir de este momento y durante la década de los 70-80, el lenguado, como especie potencial de cultivo, concentró un gran interés convirtiéndose en sujeto de un elevado número de experiencias por parte de diversos grupos de investigadores. Destacó especialmente el grupo del Dr. Metailler en Francia, en el seno del cual se desarrollaron diversas tesis doctorales sobre la especie (entre otras Cadena-Roa, 1983; Moriniere,

1983) amén de un gran número de trabajos de investigación (entre otros Metailler y Girin, 1976; Girin et al.1977; Fuchs, 1978; Fuchs, 1981/1982a, 1981/1982b; Cadena-Roa et al. 1982; Metailler et al., 1983; Person-le-Ruyet et al., 1983). También se distinguieron por su interés en el lenguado y los peces planos en general los investigadores ingleses aportando importantes resultados en la misma época (Cowey et al. 1970; Bromley, 1974, 1977, 1979; Mackie y Adron, 1978; Mackie et al. 1980; Mackie 1982; Mackie y Mitchell, 1985; para revisión ver Howell 1997).

Pero a finales de la década de los 80, el interés suscitado por la especie se redujo registrándose un cierto abandono de la línea de trabajo, en especial en Francia donde muchos trabajos se orientaron hacia otras especies, principalmente la lubina. En 1986, Barnabe definió el cultivo intensivo de lenguado como “poco prometedor”, depositando unas expectativas, un tanto inciertas, en el cultivo semiextensivo y extensivo, como el practicado en las lagunas costeras del Atlántico francés y en el sur de España y Portugal. La primera referencia bibliográfica sobre cultivo de lenguado data de 1979 (Lagardere et al., 1979) y sobre el desarrollo larvario a partir de huevos recolectados en el medio natural en las costas francesas del Atlántico.

### **2.7. Producción de *lenguado senegalés* en España**

En el año 2000 la producción del lenguado senegalés fue de 13,1 toneladas, obtenidas íntegramente en la Comunidad Autónoma de Andalucía. En Cataluña, el cultivo de esta especie se llevó a cabo principalmente en tanques instalados en tierra alcanzando producciones de 3,6 toneladas en el año 2002. En el año 2004 la producción Española de lenguado senegalés se concentró exclusivamente en los esteros y las salinas de Andalucía (31,6 toneladas ), así como en las instalaciones de la empresa Culmarex, ubicada en las Islas Baleares (26 toneladas) (JACUMAR, 2006).

En el año 2006 la producción fue de 80 toneladas, distribuidas entre las comunidades de Andalucía (55 Tm), Galicia (25 TM) (APROMAR, 2006). En el año 2008 se produjeron 316 Tm. Su producción se desarrolla en Galicia, Canarias y Andalucía. En 2009 podría alcanzar una producción de 420 Tm. En cuanto a su reproducción, en 2008 se produjeron 600.000 alevines (APROMAR, 2009).



Fig.2.7.1. Producción de *lenguado* en España entre de los años 2000 y 2008.

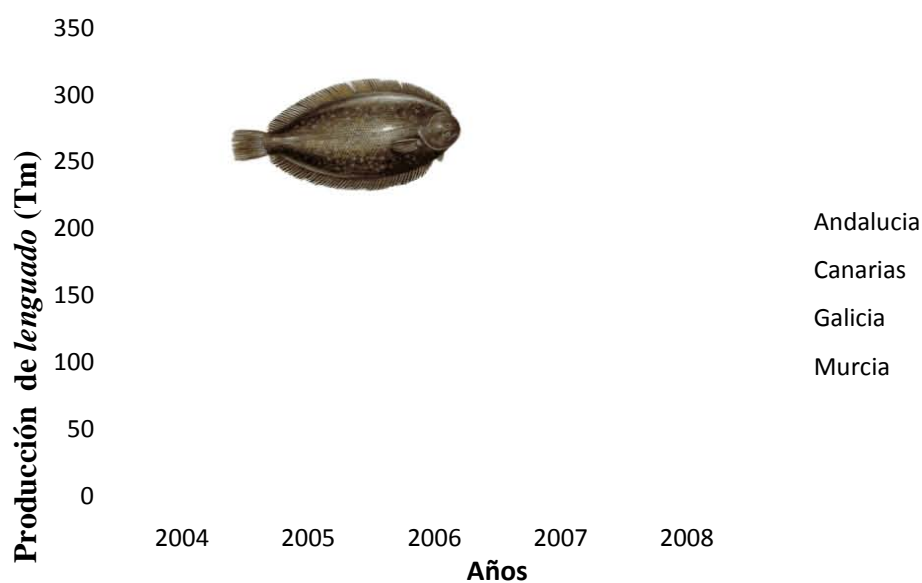


Fig.2.7.2 Producción por comunidades autónomas de *lenguado senegalenses*.

El esfuerzo científico llevado a cabo con el lenguado senegalés no se ha visto recompensado a nivel industrial, ya que en la mayoría de casos la producción comercial de esta especie se lleva a cabo en sistemas de cultivo extensivo o semi-extensivo, con un nivel de producción final que no alcanza el nivel considerado como industrial. Esto es debido principalmente a que los conocimientos zootécnicos para realizar el ciclo biológico completo a través de métodos intensivos de producción, se encuentran muy repartidos entre las distintas instalaciones y productores (Cañavate, 2005). A esto se añaden los problemas que aún plantea esta especie en términos de destete, por la mala aceptación de los piensos existentes en el mercado, y la aparición de enfermedades debidas a patógenos oportunistas que aparecen de manera imprevista (Cañavate, 2005).

El lenguado destaca por su buena aceptación en el mercado y por la posibilidad de que producirse en las actuales instalaciones marinas en tierra con pocas modificaciones estructurales.

## **2.8 Métodos para la obtención de larvas de lenguado senegalés**

### **2. 8.1. Incubación de los huevos**

La incubación de los huevos de lenguado senegalés se realiza a distintas temperaturas, desde 19 °C (Cañavate y Fernandez- Díaz, 1999) a 20 °C (Cañavate et al., 2006) o temperatura entre 18 °C y 21 °C (Dinis et al., 1999). La salinidad se mantiene alrededor de  $35 \pm 1 \text{ gL}^{-1}$  (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dinis et al., 1999; Fernández-Díaz et al., 2001; Morais et al., 2004b; Cañavate et al., 2006). El tanque que se utiliza para la incubación es de tipo de cilindro-cónico, con volumen medio de 300 L (Cañavate y Fernandez-Díaz, 1999), tipo de fibra de vidrio (cilindro-cónico) entre 150 L (Dinis, 1992) y 500 L (Vázquez et al., 1994) y dotados de abundante aireación y



renovación continúa  $0,50 \text{ min}^{-1}$  (Cañavate y Fernandez-Diaz, 1999), y  $0,65 \text{ min}^{-1}$  (Dinis, 1992).

### **2.8.2. Cultivo larvario**

Tras la eclosión las larvas son trasladadas a tanques de fibra de vidrio cilíndricos 200 L; la densidad es de  $100 \text{ larvas L}^{-1}$  (Dinis et al., 1996; Dinis et al., 1999; Dinis et al., 2003).

Los parámetros ambientales utilizados para el cultivo del lenguado senegalés son: temperatura  $20,02 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y salinidad de  $35 \pm 1 \text{ gL}^{-1}$  (Cañavate y Fernández-Diaz, 1999; Dinis et al., 1999; Fernández-Diaz et al., 2001; Morais et al., 2004b; Cañavate et al., 2006). El fotoperiodo, 16L: 8O (Cañavate y Fernández-Diaz, 1999).

### **2.8.3. Alimentación larvaria**

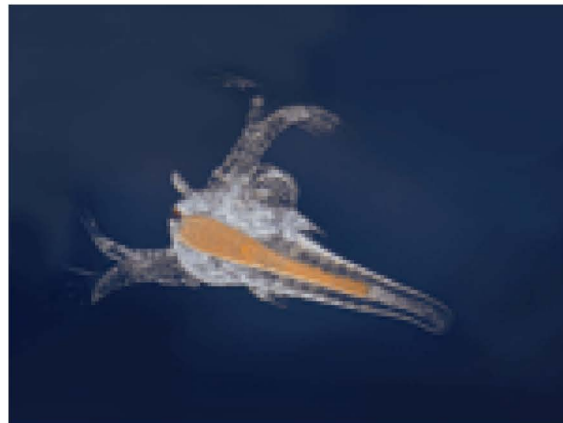
El régimen alimentario durante el cultivo larvario se basa en uso de rotíferos y fitoplancton marino en el tanque de cría durante de los 4 a 6 primeros días después de la apertura de la boca, para continuar a base de *Artemia* hasta los 40 a 60 días de edad, según el caso. La flexibilidad en las fechas de cambio de los tipos de alimento larvario es bastante grande, existiendo experiencias, incluso, en las que no se utiliza rotífero, pasando a alimentar las larvas directamente con nauplios de *Artemia* (Aragao, 1999; Cañavate, 2005).



A; Rotífero



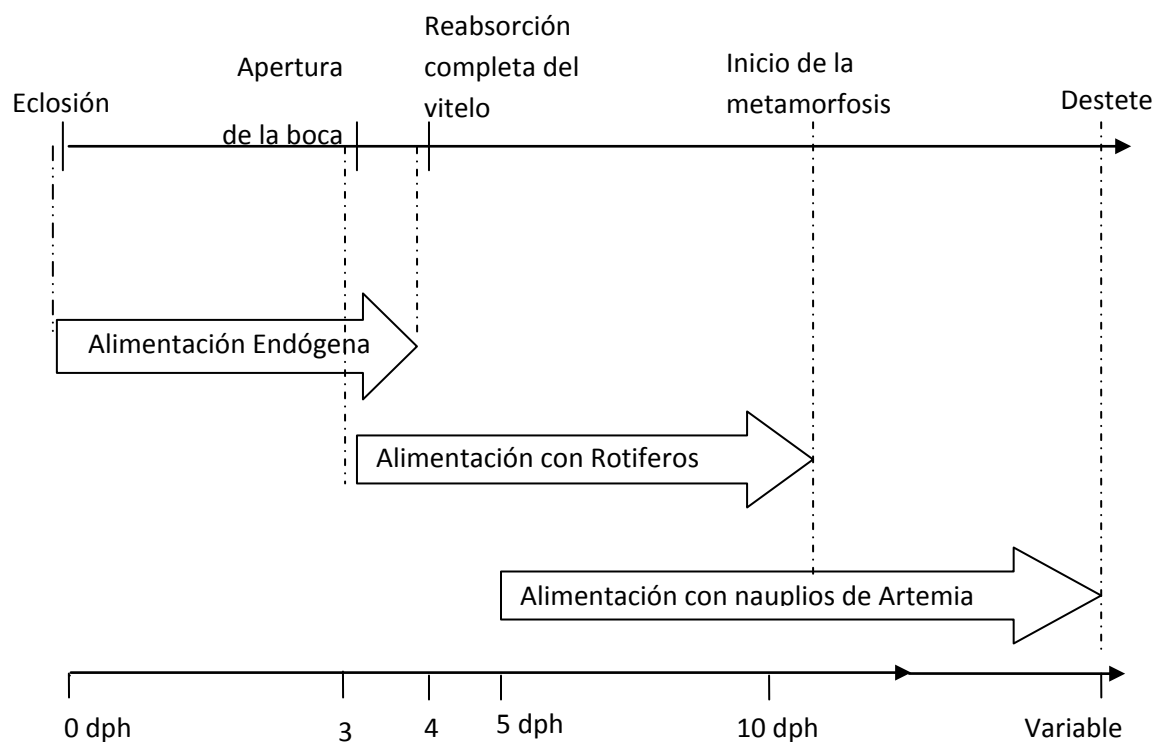
B; Adultos de Artemia (*Artemia sp.*)



C; Metanuplio de *Artemia salina* que tiene enriquecedor de Easy selco

**Fig.2.8.3.1.** Representación de distintos tipos de presa viva (A: rotífero, B: *Artemia* adulta; C: nauplio de *Artemia* enriquecido).

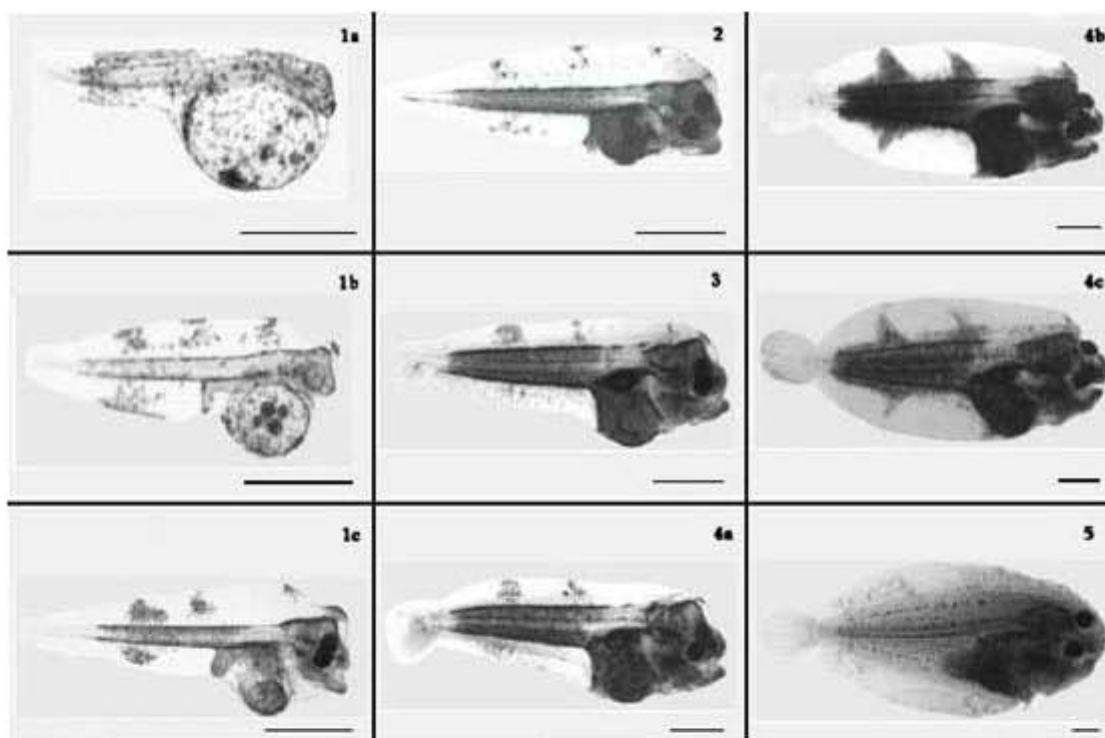
Algunos autores proponen la utilización de nauplios de *Artemia* como primera y única presa viva (Bedoui, 1995; Aragao, 1999). Tras la metamorfosis, cuando la larva pasa a ser bentónica, hay autores (Morais et al., 2004 a) que utilizan metanauplios enriquecidos y posteriormente congelados.



**Fig.2.8.3.2.** Protocolo de alimentación estándar para larvas de lenguado senegalés (T=19° C) dpe (después de la eclosión) según IRTA-SCR.

El cultivo larvario y la obtención de alevines en criadero es un proceso asequible, que no presenta dificultades significativas. Los estados pre-metamórficos del lenguado se caracterizan por presentar elevadas tasas de crecimiento y una gran resistencia a las condiciones de cultivo. Bajo condiciones óptimas, prácticamente la totalidad de la población larvaria es capaz de efectuar la metamorfosis, hacia los 20-21 días de edad (Fernández-Díaz et al., 2001).

En relación al proceso de engorde, el crecimiento de los juveniles de *S. senegalés* durante la fase final de engorde se realizó en un principio en estanques de tierra (Drake et al., 1984). En estanques de 1000 m<sup>2</sup> y utilizando una alimentación con pienso, se ha descrito un peso medio de 456g, alcanzado por los lenguados en un año de cultivo (Dinis et al., 1999). Estos resultados de crecimiento son parecidos a los obtenidos bajo condiciones intensivas (Olmedo et al., 2003; Rodríguez y Souto, 2003) y sugieren la idoneidad de esta especie para el engorde, a diferencia del menor crecimiento citado para *S. solea* (Howell, 1997).



**Fig.2.8.3.3.** Estadios de desarrollo de las larvas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

## 2.9. Función de ácidos grasos esenciales (AGA)

Ácidos grasos altamente insaturados con 20 o más átomos de carbono y tres o más dobles enlaces (HUFA) son esenciales componentes de las membranas celulares y puede modular la procesos fisiológicos, incluido el transporte de membrana, receptor de la función y actividades enzimáticas. Por lo tanto, en la dieta, los ácidos grasos se han demostrado para tener efectos marcados sobre una variedad de los parámetros inmunológicos y hemostáticos . (Balfry et al. 2001, Montero et al. 2001).

HUFA posee una gran variedad de las funciones celulares, y la más importantes es proporcionar los precursores para la síntesis de eicosanoides, que se producen en respuesta a diversos estímulos extracelulares por dos tipos principales de enzimas dioxigenasa: ciclooxigenasas (COX) y lipoxigenasas (Horrobin 1983).

Después de la estimulación celular, tanto el ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) son liberados de la membrana por la acción de la fosfolipasa A2. Más tarde estos ácidos grasos son transformados por una serie de lipoxigenasas y ciclooxigenasas para producir prostaglandinas (PG), leucotrienos, lipoxinas y otros compuestos, que son capaces de modular varias funciones inmunes modulan varias funciones inmunes (Uhing et al. 1990).

Los eicosanoides se han encontrado en una gran variedad de agua dulce y peces marinos (Matsumoto et al. 1989, Mustafa & Srivastava 1989) y en muchos tejidos (Henderson & Tocher 1987, Bell et al. 1994a, Tocher 1995). En los peces, un preferido de eicosanoides precursor de la ciclooxigenasa parece ser ARA (20:4 n-6) (Tocher y Sargent 1987, Bell et al. 1994a, 1994b, 1998), pero EPA (20:5 n-3) y ácido dihomo-g-linolénico (DHGLA; 20:3 n-6) también son importantes precursores de eicosanoides que son capaces de modular la producción y la eficacia biológica de la ARA derived eicosanoides (Horrobin 1983, Bell et al. 1994a, Ganga et al. 2005).

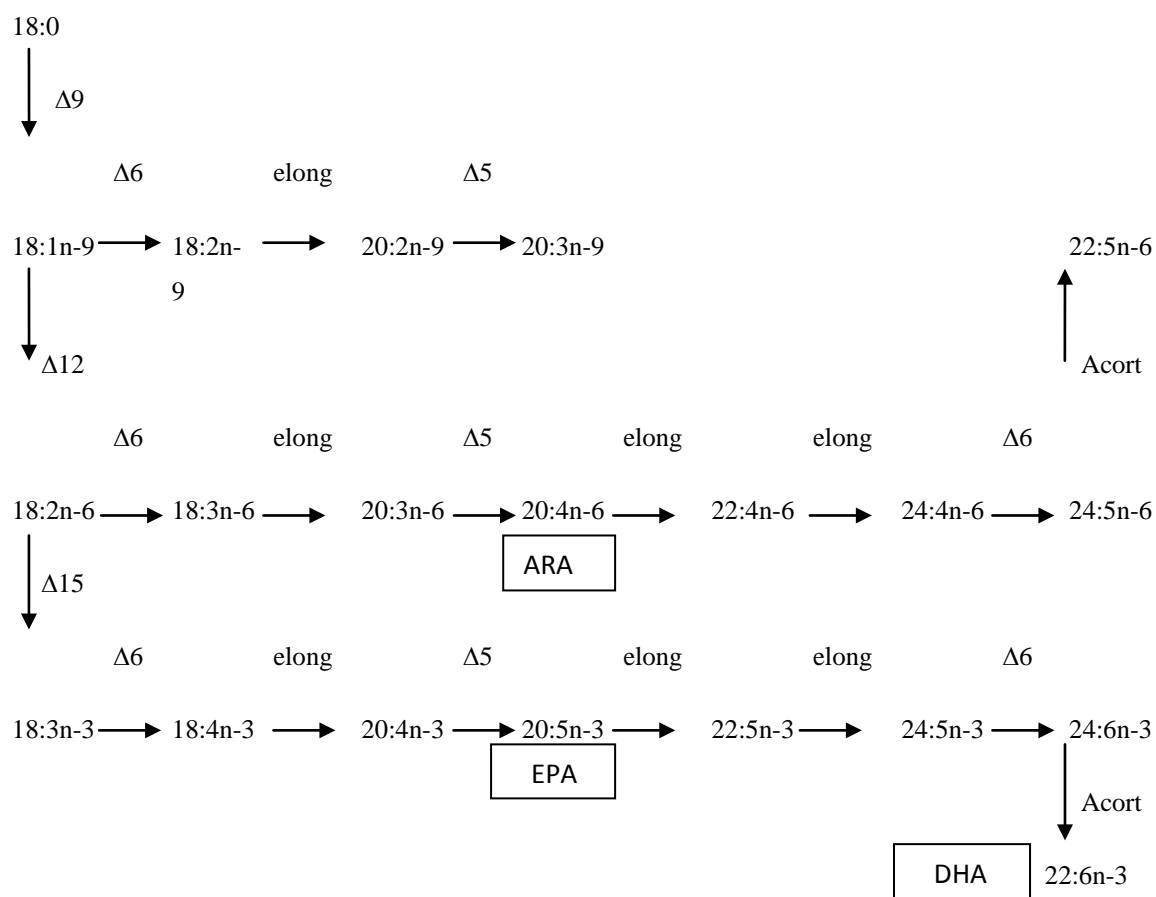
Además, el alto contenido de ácido docosahexaenoico ácido (DHA, 22:6 n-3) en las membranas celulares afecta eicosanoides producción (Nablone et al. 1990). Este ácido graso es también reconocido como un precursor de determinados biológicamente activa derivados trioxilated (Alemán et al. 1983, Hong et al. 2005). Por lo tanto, el suministro de precursores poliinsaturados ácidos grasos con 18 o más átomos de carbono y dos o más dobles enlaces (AGPI) para la síntesis de eicosanoides está directamente relacionados con la composición de ácidos grasos de la membrana fosfolípidos, que a su vez está influenciado por la dieta PUFA la ingesta y el metabolismo (Tierras de 1989).

### **2.9.1. Los ácidos grasos en alimentación de peces marinos**

Los ácidos grasos saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) pueden ser sintetizados *de novo* por todos los organismos, incluidos los peces (Sargent,1989). Se sintetizan mediante la unión de unidades de acetyl-Coa, que tanto pueden proceder de una fuente proteica como glucídica (Tocher, 2003).

A partir de los ácidos grasos palmítico y esteárico y mediante la acción de un enzima desaturasa (eliminación de dos átomos de H aparición de un doble enlace en la cadena de C), se obtienen los ácidos grasos palmitoleico (16:1n-7, PO) y oleico (18:1n-9, OA) respectivamente. Este proceso también lo pueden llevar a cabo todos los organismos ( Tocher, 2003). A partir del OA y mediante la acción de desaturasas que actúan consecutivamente, se forman los ácidos grasos linoleico ( 18:2n-6, LA) y posteriormente linolénico (18:3n-3, LNA) considerados los precursores del resto de ácidos grasos de cadena larga (>20C). A partir del LA y mediante la acción de dos enzimas desaturasas y un enzima elongasa (adición de 2 átomos de C a la cadena ) se forma el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) y de la misma manera, a partir del LNA se

forma el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), el cual, tras dos elongaciones, una desaturación y un acortamiento de la cadena de C, dará lugar al ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). Los ácidos grasos ARA, EPA y DHA se denominan poliinsaturados (PUFA), al poseer más de dos dobles enlaces en su cadena. Las reacciones de desaturación y elongación que constituyen los pasos en las rutas de síntesis de los PUFA, se esquematizan en la figura 2.9.1.3. Del grado de actividad de los enzimas elongasa y desaturasa que llevan a cabo estos procesos, dependerá el que una especie deba obtener cada uno de los ácidos grasos de su dieta, y de este modo satisfacer sus requerimientos (Tocher, 2003).



**Fig. 2.9.1.1.** Ruta de síntesis los ácidos grasos poliinsaturados. ( $\Delta$ = desaturasa, elong = elongasa, acort =acortamiento de la cadena) (Tocher, 2003).

### 2.9.2. Requisitos esenciales de los ácidos grasos en peces marinos

Los organismos acuáticos requieren ácidos grasos poli insaturados (PUFA) de cadena larga y para los peces marinos, los ácidos grasos de la serie n-3 se consideran esenciales. (Watanabe, 1987, 1988).

Los peces marinos contienen grandes cantidades de 22:6n-3 y 20:5n-3 en los fosfolípidos de sus membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar el 22:6n-3 de novo ni a partir de precursores de cadena más corta, como el 18:3n-3. Por lo tanto, 22:6n-3 y 20:5n-3 son los componentes esenciales en la dieta para peces marinos.

Así, juveniles de arenque privados de 22:6n-3 tienen un impedimento para capturar su presa a bajas intensidades de luz cuando las células de la retina son operativas (Bell, et al., 1995a, b). Por lo tanto, una insuficiencia de 22:6n-3 en la dieta de larvas de peces marinos es probable que pueda perjudicar el desarrollo neuronal y visual con graves consecuencias para toda una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluso que dependen de del sistema de neuroendocrino. Como se mostró anteriormente (Sargent et al., 1997, 1999), el 22:6n-3 está presente en concentraciones muy altas en membranas células neuronales y visuales, en peces como en mamíferos.

La pigmentación anormal es común en las larvas de peces planos marinos, que incluyen lenguado japonés, rodaballo y el halibut, que puede ser substancialmente mejorado si se mejora el nivel de 22:6n-3 en el alimento vivo de las larvas (Kanazawa et al., 1981; Kanazawa, 1993; Reitan et al., 1994; McEvoy et al., 1998). Se ha considerado que una mala pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, del procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el



propio ojo, o subsecuente en el cerebro, de la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de distribuciones sinápticas entre los nervios y melanóforos en la piel. Sin embargo, no hay evidencia experimental directa para cualquiera de estas posibilidades y esto es igualmente posible que las membranas de los melanóforos determinen la pigmentación que pueden ser afectados directamente por la privación de 22:6n-3.

Una incertidumbre fundamental en cuanto a las causas del síndrome de mala pigmentación en peces planos marinos es si la falta misma de 22:6n-3 es la causa principal. Esta incertidumbre se debe a que gran parte del trabajo original, donde el suplemento de alimento vivo fue llevado a cabo con aceite de pescado con bajos niveles de 22:6n-3 con respecto a 20:5n-3, es decir, aceites con una relación de 22:6n-3: 20:5n-3, de alrededor de 1:1, el cual es característico de la mayoría de aceites de pescado disponibles comercialmente (Navarro, et al., 1999).

La incertidumbre sigue si el síndrome de mala pigmentación es causado por una deficiencia de 22:6n-3 o un exceso de 20:5n-3. El problema es que es prácticamente imposible de manipular el nivel de 22:6n-3 en el alimento vivo suplementado sin que ello implique alterar el nivel de 20:5n-3. Por otra parte, la incertidumbre se refiere no solamente al rol del 20:5n-3 como un mayor constituyente de la estructura de fosfolípidos de las membranas celulares, pero no participa en la producción de eicosanoides (3 - prostanoïdes serie y 5 - leukotrienos serie). Esto a su vez plantea consideraciones de 20:4 n-6 el precursor importante de eicosanoides (2-prostaglandinas serie y 4 - leukotrienos serie) en peces como en mamíferos al (Sargent et al., 1997, 1999).

Dado que los peces marinos no pueden convertir C18 a C20, los ácidos grasos poli insaturados y porque 20:4n-6 tiene una importante función fisiológica en la producción de eicosanoides, el 20:4n-6 es por definición, un ácido graso esencial en peces marinos. Aunque directamente no hay evidencia concluyente nutricional para que exista en peces (Castell et al., 1994; Bell et al., 1995a, b).

### **2.9.3. La utilización de los ácidos grasos en lenguado senegalés**

En cuanto a la nutrición de lípidos en larvas de lenguado senegalés, muy pocos estudios se centran en los requisitos de ácidos grasos y su utilización durante el desarrollo larval hasta el momento (Vásquez et al., 1994; Mourente y Vásquez, 1996; Morais et al., 2004c; Villalta et al., 2005 a.).

En comparación con el perfil de ácidos grasos de huevos de otras especies de peces marinos, los huevos de lenguado senegalés tienen un alto contenido de ácido docosahexaenoico / ácido eicosapentanoico (DHA / EPA) la relación de 4/3, en contraste con la proporción de 2/3, que normalmente se encuentran en otras especies (Morais et al., 2004c). Sin embargo la concentración absoluta de DHA y EPA en los huevos de lenguado senegalés no es muy elevada y además es considerablemente inferior al de otros análisis de especies (Morais et al., 2004c). La composición del huevo está más probablemente relacionada con la dieta bentónica de reproductores, sobre la base de calamar complementado con poliquetos durante la maduración final.

Como se observó en otras especies, el perfil de ácidos grasos de larvas de lenguado senegalés alimentados con *Artemia* enriquecida de manera diferente, en general, reflejó la composición de su dieta, excepto para el contenido de DHA en larvas.

(Rainuzzo et al., 1994; Reitan et al., 1994; Pousão-Ferreira et al., 1997; Estévez et al., 1999; Villalta et al., 2005a,b).

En Morais et al., 2004c aunque su nivel fue superior de presas vivas alimentadas con un mayor contenido de DHA, las larvas siguen presentando ácidos grasos esenciales en cantidades considerables cuando se suministra en pequeñas cantidades en la dieta. Esto es probablemente el resultado de una conservación selectiva de DHA presente en el vitello, como la síntesis o conversión (a través de la elongación y de saturación) de la EPA que es poco probable que se produzca a un ritmo suficiente (Morais et al., 2004c; Villalta et al., 2005 a).

En la actualidad, no hay indicación de que EPA se utiliza con fines energéticos ni tampoco como precursor para su elongación en ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5n-3) y por consiguiente en ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3). Sin embargo, los resultados obtenidos en los trabajos de Morais et al. (2004c) no apoyan la hipótesis de una elongación y desaturación de la EPA en DHA, dado que cuando las larvas se alimentaron con *Artemia* no enriquecida con DHA, los niveles de EPA y DPA se conservaron o incluso aumentaron ligeramente, mientras que el nivel de DHA aumentó durante desarrollo larvario. Al mismo tiempo, estos resultados parecen indicar una fuerte conservación de los ácidos grasos esenciales en lugar de su biosíntesis.

Durante el desarrollo de larvas de lenguado senegalés normalmente hay una disminución en concentración de los ácidos grasos, que apoya la idea de que las larvas de peces tienen un rápido metabolismo y una alta demanda en nutrición, usando los lípidos como fuente de energía metabólica, así como los ácidos grasos esenciales (Vázquez et al., 1994; Mourente y Vázquez, 1996; Morais et al., 2004c).

Vásquez et al. (1994) y Mourente y Vásquez (1996) demostraron que el total de los ácidos grasos saturados y mono insaturados se catabolizan como sustratos de energía, mientras que los ácidos grasos poli insaturados se conservan. Moráis et al. (2004c), por otra parte encontró que los ácidos grasos poliinsaturados fueron igualmente utilizados durante el desarrollo de las larvas y sólo los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA).

Vásquez et al., (1994) y Mourente & Vásquez (1996) sugirieron la existencia de un requerimiento específico para ARA en el primera etapa de desarrollo larval. Sin embargo, esto no fue confirmado por el trabajo de Morais et al., (2004c). Pero ARA estuvo siempre presente en cantidades considerables en la composición de la larva, incluso cuando las presas tenían un bajo contenido de ARA. Villalta et al., (2005a) examinó el efecto de las cantidades de ARA en las dietas para las larvas de lenguado senegalés y no encontró ninguna correlación entre niveles de ARA y el crecimiento y supervivencia de las larvas. Sin embargo, dietas incluyendo ARA en grandes cantidades se encontró que afectan de forma significativa la pigmentación, aumentando la frecuencia de animales albinos (Villalta et al., 2005a).

Cuando el enriquecimiento de diferentes lípidos fueron evaluados en función de su contenido en larvas de lenguado senegalés, se encontró una correlación significativa entre la concentración en la presas de HUFA o DHA / relación de la EPA y el crecimiento de las larvas (Morais et al., 2004c). Sin embargo, Villalta et al., (2005b), no encontró un relación significativa entre la dieta y el DHA de crecimiento y la supervivencia de las larvas de lenguado senegalés. De hecho, las larvas de lenguados pueden crecer con *Artemia* no enriquecida que presenta un nivel muy bajo de ácidos grasos (Morais et al., 2004c, 2005 a,b). Según Morais et al. (2004c), un mejor crecimiento fue alcanzado con *Artemia* no enriquecida, que con *Artemia* enriquecida

con súper HUFA que es un producto comercial de enriquecimiento que induce un mayor nivel de HUFA y en la relación DHA/EPA.

Otros resultados de Morais et al. (2006), muestran que en lenguados alimentados únicamente con *Artemia* enriquecida en mayor o menor dosis de una emulsión de aceite de soja (deficientes en ácidos grasos esenciales) o una emulsión de aceite de 16 a 32 dpe. Hubo una ligera tendencia en una disminución para el crecimiento con la dieta de aceite de soja, pero esto fue sólo significativo para la *Artemia* enriquecida con una dosis baja de aceite de soja.

Por lo tanto, parece que las larvas de lenguado senegalés son menos exigentes en requerimientos nutricionales para (n-3) HUFA, que contrariamente a la mayoría de las larvas de peces marinos no pueden ser criados con una dieta deficiente en HUFA. Resultados similares se encontró en otros peces planos, como el Europeo lenguado común (*Solea solea*), lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) donde el crecimiento y las altas tasas de supervivencia se puede lograr con las dietas, casi deficientes en DHA, siempre que hubiera una suficiente disposición de la EPA (Howell y Tzoumas, 1991; Dickey- Collas y Geffen 1992; Izquierdo et al., 1992). Sin embargo, los peces planos con otros por lo general más en la etapa larvaria, como el lenguado y rodaballo requieren un suministro en la dieta de HUFA para el crecimiento y desarrollo normal (Bell et al., 1985; Copeman et al., 2002).

#### **2.9.4. Efecto de los ácidos grasos en desarrollo esquelético en peces marinos**

La mayoría de las deformaciones esqueléticas y problemas pigmentarios aparecen durante las fases larvaria y juvenil, es decir durante un corto periodo de tiempo donde diversos procesos biológicos influyen en la organogénesis, morfogénesis y metamorfosis del animal. En general, las larvas de peces marinos eclosionan con un

estadio de desarrollo menos avanzado que el de los vertebrados superiores, lo que implica que la secuencia del desarrollo del sistema esquelético y pigmentario en teleósteos sea considerablemente deferente a la de estos. Las deformidades esqueléticas y problemas de despigmentación pueden ser causadas por diversos motivos, siendo la nutrición uno de los más importantes (Gisbert et al., 2008).

El aporte de los lípidos en la dieta es fundamental para satisfacer los requerimientos en ácidos grasos esenciales el mantenimiento de la integridad y fluidez de membrana celular, el transporte de vitaminas liposolubles y el suministro de energía (Guillaume et al., 2002). El tejido óseo de los peces puede llegar a contener del 24 al 90% en peso de lípidos; además, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son elementos celulares importantes en todos los tejidos.

Determinados PUFAs como el ácido araquidónico (ARA), eicosapentanoico (EPA) y linolénico, son precursores de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, dos tipos de eicosanoides que entre sus funciones fisiológicas se encuentran la de regular el metabolismo de las células óseas. Las prostaglandinas estimulan la reabsorción del hueso a través de los osteoclastos, aunque también están implicadas en la síntesis de nuevo tejido (osteoblastos) y matriz ósea, al regular la síntesis de factores del crecimiento (IGFs). En este sentido se ha demostrado que larvas de lubina alimentadas con dietas que contienen 1,1 y 2,3 % de EPA y DHA en la fracción lipídica (13% fosfolípidos) mostraron un buen crecimiento, desarrollo y una baja incidencia de deformaciones esqueléticas, en comparación con otras alimentadas con 4.8% de los citados ácidos grasos, donde la incidencia de animales deformes (escoliosis, compresión y deformación vertebral, y deformaciones del esqueleto faríngeo) fue del 43% de los animales. El efecto de dichos nutrientes sobre la esquelética génesis vendría dado por una

alteración de diversas familias de genes morfogenéticos que regulan el desarrollo y formación del hueso (Villeneuve et al., 2005b).

Recientemente se ha puesto de manifiesto que los lípidos pueden tener un efecto tóxico en un periodo muy corto de tiempo, al existir ventanas en el desarrollo, en las que las larvas son muy sensibles a desequilibrios nutricionales relacionados con la fracción lipídica de la dieta (Villeneuve et al., 2006). En este sentido, los autores anteriores evaluaron el efecto de un exceso de estos ácidos grasos desde el inicio de la alimentación exógena hasta 13 días. Anteriormente la plasticidad en el número de vértebras se había asociado a la temperatura (Lewis et al., 2004) y a los procesos de triploidía (Kacem et al., 2004), y ha sido a partir del estudio de Villeneuve et al., (2006) que se ha demostrado un claro efecto de la dieta en la diferenciación de la columna vertebral y la formación de cuerpos vertebrales.

Finalmente no hay que olvidar que los PUFAs son moléculas altamente susceptibles al stress oxidativo degradándose por peroxidación lipídica. La peroxidación conlleva la formación de radicales libres altamente tóxicos para la célula que pueden ser responsables de alteraciones en el patrón normal de desarrollo y crecimiento del organismo (inhibición de la formación de osteoclastos), resultando en importantes malformaciones esqueléticas (Fontagné et al., 2006; Lall y Lewis- McCrea, 2007). Además, durante el proceso de autooxidación, hidroxiperóxidos, aldehídos y cetonas; que reaccionan con otros ingredientes de la dieta (vitaminas, proteínas, y otros lípidos) disminuyendo su valor biológico y disponibilidad durante la digestión, hecho que también puede afectar al proceso de desarrollo del sistema esquelético (Gisbert et al., 2008).

### 2.9.5. Sistema digestivo en lenguado senegáles

En general, la digestión de los peces teleósteos se caracteriza por un conjunto de procesos químicos por los que algunas enzimas especializadas catalizan la ruptura de las moléculas que componen los alimentos en compuestos simples y pequeños para que puedan atravesar las membranas celulares y ser incorporados en los tejidos corporales. Las proteínas son digeridas por la hidrólisis de un grupo de enzimas proteolíticas que se denominan proteasas (p.ej. pepsina, tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, Aminopeptidasa) y que actúan rompiendo los enlaces peptídicos. La digestión de las proteínas sufre diversas alteraciones a lo largo del desarrollo larvario (Cahu y Zamboino Infante, 1994). Las larvas al principio del desarrollo no poseen estómago (carecen digestión ácida), aunque, se ha observado la digestión de las proteínas en la región posterior del intestino. El incremento de la longitud del intestino les permite un mayor tiempo de digestión de las proteínas, compensando la carencia de una digestión ácida.

El lenguado senegalés presenta un rápido desarrollo del sistema digestivo. De un segmento sólo tubular, cerrada en ambos extremidades (boca y el ano), con histología indiferenciada por un epitelio cilíndrico.

Las larvas de lenguado se desarrollan en la primera alimentación (dph), un tracto digestivo en espiral, histológicamente funcional dividido en diferentes secciones: la cavidad bucal, faringe, el estómago, el anterior y posterior intestino (Ribeiro et al., 1999a). Comparación en la diferenciación del tracto digestivo en el momento de la primera alimentación también ha sido descrito para lenguado, rodaballo, limanda (*Limanda limanda*), dorada y lubina. ( Vu, 1983; Cousin y Baudin –Laurencin, 1985; Boulhic y Gabaudan, 1992; Kjorsvik y Reiersen, 1992; Segner et al., 1994; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete et al., 1995; Baglolle et al., 1997).



El páncreas y el hígado también se desarrollan antes de la primera alimentación en lenguado senegalés. En larvas de lubina europea, los gránulos zimógeno aparecen en la mitad del periodo de alimentación endógena y se convierten en abundantes al inicio de la alimentación exógena (Beccaria et al., 1991). Granulos de Zimógeno se detectaron en páncreas por primera vez a los 2 dpe de platija japonesa utilizando anti-tripsinogeno , un día antes de la primera alimentación y en ese momento se observaron el conducto pancreático. La ausencia de un estómago funcional en la primera alimentación indica una fuerte dependencia en el lenguado senegalés de las enzimas pancreáticas para la digestión de proteínas (proteasas alcalinas), como se observa para la dorada, lubina, rodaballo y lenguado de Dover (Vu, 1983; Cousin y Baudin-laurencin 1985; Boulhic y Gabaudan, 1992; Kjørsvik y Reiersen, 1992; Segner et al., 1994; Sarasquete 1995). La capacidad digestiva de lenguado aumenta únicamente durante el desarrollo mediante el aumento del volumen disponible para la digestión y el área de absorción, a través del alargamiento del tubo digestivo, el aumento mucosa intestinal del tamaño y número de pliegues.

El lenguado senegalés presenta una actividad de enzimas digestivas antes de abrir la boca, lo que indica una capacidad de eficiencia en la actividad específica de varias enzimas digestivas como la tripsina, amilasa, fosfatasa alcalina, lucina alanina, aminopeptidasa, patrones similares en todo el desarrollo, caracterizado por una fuerte variación en los primeros 10 días disminuyendo a un valor bastante estable en las etapas posteriores del desarrollo (Ribeiro et al., 1999b). Este patrón de la variación también fue descrita para la lubina europea, la dorada, la corvina. (Zambonino-Infante y sereno, 1994 a; Moyano et al., 1996; Buchet et al., 1997; Ribeiro et al., 2005) y específica en las primeras etapas larvarias de los peces (Zambonino infante y Cahu, 2001). Establecer mecanismos podría retrasar el desarrollo larvario y afectar la aparición de las funciones

de secreción del páncreas en lenguado senegalés, pareciera tener plenamente en funcionamiento los mecanismos de secreción pancreática antes del 21 dpe , lo que indica un momento en que una dieta inerte adecuada podría introducirse (Ribeiro et al., 1999b). Otra característica importante en la fisiología digestiva de lenguado es la maduración de los enterocitos alrededor de 25 dpe, lo que es indicio de una forma adulto de la digestión que se refleja por la aumento de la actividad de las enzimas del borde en cepillo ( fosfata alcalina y aminopeptidasa) y al mismo tiempo que disminución de la actividad de la enzima citosolica leucina alanina peptidasa. (Ribeiro et al., 1999).

La actividad de la pepsina sólo se observó en post larvas de lenguado de más de 35 dpe (Ribeiro et al., 2002).A lo largo del desarrollo del lenguado, la actividad de la tripsina (enzima pancreática) disminuye (Person, 1993) este hecho está correlacionado con el desarrollo del estomago (aparición de las glándulas gástricas) y consecuente aumento del actividad de la pepsina (Yúfera et al., 2004), mecanismo mediante el cual la larva/juvenil optimizará la digestión de los compuestos proteicos, sin necesitar de la sola contribución de la tripsina. La digestión de los carbohidratos comienza en el estómago con la presencia de amilasas (polisacaridasa). Esta digestión continúa en el intestino mediante las amilasas contenidas en el jugo pancreático. La actividad de la amilasa, otra enzima pancreática, se ve disminuida a lo largo del desarrollo en parte por la disminución de los requerimientos en carbohidratos. Fue demostrado en diversas especies, incluyendo la lubina (Cahu y Zamboino Infante, 1997) y el lenguado (Ribeiro et al., 1999), que la actividad de los enzimas intestinales (del borde del cepillo) incrementa con la edad de los animales, pudiéndose considerar como un indicador del grado de maduración del intestino. La disminución, con la edad, de determinados enzimas pancreáticos y el aumento de los enzimas intestinales como la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa del borde del cepillo de los enterocitos, es característico de una

maduración normal esta región del tracto digestivo (Henning, 1987). La digestión a nivel de la membrana del borde del cepillo, representa el modo adulto de digestión.

En este estudio todos los resultados de la actividad de los enzimas se expresaron por proteína (mU/mg Proteína). A nivel ontogénico, se observó que los enzimas pancreáticos disminuyeron su actividad con el paso del tiempo en algunas emulsiones, mientras que los enzimas intestinales aumentaron su actividad y que los enzimas pancreáticos presentaron una menor actividad (mU/mg Proteína) relativamente a los enzimas intestinales.

El patrón de variación de la actividad de la tripsina observado en este estudio fue similar al descrito anteriormente en algunas emulsiones, pero dicha actividad aumento también en algunas emulsiones. El patrón de variación de la actividad de la amilasa y lipasa, en este estudio, es igual a la de otra especies como la lubina y la especie *Theragra chalcogramma* (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a; Oozeki y Bailey, 1995). Se pudo observar que ambas enzimas pancreáticas disminuyeron sus actividades con la edad. El patrón de variación de la actividad de la leucina alanina observado en este estudio fue similar al descrito anteriormente y su actividad se parece actividad de fosfatasa alcalina. La actividad de la fosfatasa alcalina se aumentó constante hasta el día 30, lo que nos indica que la funcionalidad del intestino es similar a diferentes edades (Ribeiro, 1999). La actividad de esta enzima disminuyó a partir del día 30 dpe. La actividad de la aminopeptidasa disminuyó constantemente en algunas emulsiones hasta el día de 30 y su actividad se aumentó en el día 38 dpe. Dicha disminución podría venir explicada por el cambio en la dieta que está sometido el animal (destete), puesto que al final del experimento los niveles se recuperan.

En relación al efecto de distintas emulsiones sobre el desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo, los resultados parecen indicar que estas emulsiones no afectaron de forma negativa al desarrollo normal de larva.

### **3.OBJETIVOS**

### 3. Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la Artemia enriquecida con las distintas emulciones y/o enriquecedores comerciales sobre :

*El desarrollo de las larvas del lenguado senegalés (Solea senegalensis) en función de su*

- ❖ Crecimiento (talla y peso seco)
- ❖ Supervivencia
- ❖ Maduración del sistema digestivo (actividad enzimas pancreáticas e intestinales)
- ❖ Metamorfosis (migración del ojo)
- ❖ Composición bioquímica



*La calidad larvaria*

- ❖ Incidencia de malformaciones esqueléticas

Esta información será de gran utilidad para aumentar nuestro conocimiento en los mecanismos nutricionales reponsables de la aparición de malformaciones esqueléticas y problemas pigmentarios en esta especie y que pueden afectar a la rentabilidad del proceso productivo.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 4. Material y métodos

El presente trabajo fue desarrollado en Centre de Sant Carles De La Ràpita – Institut Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, SCR-IRTA (Unidad de Cultivos Experimentales) (**fig. 4.1**). El trabajo se repartió en dos fases, la primera fase, dedicado al cultivo lavario, la segunda fase, dedicado al análisis de los resultados, desde diciembre 2009 hasta febrero 2010.








**Fig.4.1** Vista aérea de las instalaciones de Sant Carles de la Ràpita– Institut Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA-SCR, donde se ha llevado a cabo este estudio.

El experimento que se describe a continuación fue realizado dos veces por las causas que se describen a continuación. En un primer ensayo realizado durante julio/agosto de 2009, a mediados del experimento (20-25 dpe) se detectó un brote agudo de *Flexibacter* (temperatura agua: 20-21°C) que afectó dramáticamente el resultado de crecimiento, supervivencia y calidad larvaria. A la vista de los hechos, el trabajo fue interrumpido a la 30dpe, decidiéndose repetirlo en otoño, cuando la temperatura del agua no fuera tan elevada.



**4.1. Diseño experimental**

Para evaluar efecto de la artemia enriquecida con distintas emulsiones comerciales sobre el crecimiento y desarrollo esquelético de larvas del lenguado se establecieron 6 grupos: ES (Easy Selco®, INVE ), ES/2 (Easy Selco®, INVE diluido con aceite de oliva 2/3 % ), RP (Red Pepper®, BERNAQUA), AGG (Aquagrow Gold, ABN), AGD (aquagrow DHA, ABN), MG (Multigain, BIOMAR). El nivel de Easy Selco® contenido en el enriquecedor comercial se ha utilizado como valor control. Estos 6 tratamientos contienen aproximadamente el mismo nivel de HUFA n-3/n-6 y DHA: EPA y con diferentes gradientes de la vitamina A. Las emulsiones/productos enriquecedores comerciales usados presentan las siguientes características (**Tabla 4.1.1.**).

	Cruda lípidos (%)	Vit. A (IU/kg)	Vit. D3 (IU/kg)	Vit.E	Vit.C	DHA/EP A
Easy selco 	67%	1.500.000	150.000	3.600 mg/kg	800 mg/kg	1
AGG 	47 %	6,380.0	-	-	-	1
AGD 	35 %	2177,2	-	49,8 ppm	250,00 ppm	1
Red peper 	13,5 %	50.000	10.000	1500 ppm	13.500 ppm	0,05
Multi gain 	44%	150.000	30	0,58 %	5,1%	0,1

**Tabla 4.1.1.** Composición de las emulsiones que usaron para enriquecer *Artemia*. (Composición según de los fabricantes que producen las emulsiones/enriquecedores ensayados).

Las emulsiones se mezclaron, en distintas cantidades según los casos e indicaciones de los fabricantes, A los productos anteriormente, se añadió aceite de oliva y agua destilada y se procedió a emulsionar mediante la acción de un Ultra-Turrax T 25 (IKA, Alemania) durante 120 segundos.

### 4.2. Produccion y enriquecimiento de presas vivas

#### 4.2.1. Enriquecimiento de rotíferos

El cultivo de los rotíferos se mantiene continuamente en la sección de cultivos auxiliares de la hatchery en el SCR-IRTA. (**Fig. 4.2.1.1**). Diariamente, se extrajeron varias alícuotas de 1ml para hacer un recuento de la cantidad de rotíferos existentes en los tanques de cultivo y así calcular el volumen de rotíferos necesarios en cada una de las tomas. De estos tanques se extrajeron diariamente el número necesario de rotíferos para los tanques del cultivo larvario. A fin de eliminar restos de fitoplancton y reducir la carga bacteriana, los rotíferos cosechados se lavaron con agua marina filtrada. Los rotíferos cosechados se depositaran en tanques de 100 L para su enriquecimiento.



**Fig.4.2.1.1.** Sala de cultivos auxiliares del IRTA. A la izquierda cultivo de micro algas y a la derecha cultivo de *rotíferos* y *Artemia*

## Material y métodos

La densidad utilizada para el enriquecimiento del rotífero fue 250 rotíferos mL<sup>-1</sup> y la cantidad de enriquecedor 0,15 g de Easy Selco L<sup>-1</sup> según indicaciones del fabricante. Los rotíferos fueron enriquecidos bajo fuerte aireación y suficiente aporte de oxígeno. Tras el enriquecimiento se lavaron con agua de mar y posteriormente con agua dulce, ambas tratadas con luz U.V. para eliminar el exceso de grasa del enriquecedor y carga bacteriana.

### 4.2.2. *Enriquecimiento de Artemia*

Diariamente se calculó la cantidad de quistes de *Artemia* a poner a eclosionar y a enriquecer en días posteriores. Una vez los quistes eclosionados, éstos eran puestos a enriquecer según la necesidad requerida para cada tratamiento. Se realizaron varias alícuotas de 1ml para hacer un recuento de la cantidad de *Artemia* eclosionada y así calcular la cantidad (el volumen) de nauplios de *Artemia* necesaria diariamente para cada tratamiento y toma.

Los nauplios recién eclosionados se obtuvieron por simple decantación fueron lavados en H<sub>2</sub>O dulce y se transfirieron a 6 tanques plásticos de 100 l cada uno, provistos de agua salada, oxígeno y de suficiente aireación y fueron enriquecidos con las emulsiones experimentales durante 16 horas a 28,5 °C.



**Fig. 4.2.2.1.** Imagen de los tanques usados para enriquecer los nauplios de *Artemia*.

En cada cubo se enriqueció la *Artemia* con las emulsiones experimentales con las distintas emulsiones de enriquecedores. (Easy Selco, Eeasy Selco/2, Red Pepper, Aguagrow Gold, Aguagrow DHA y Multigain).

Una vez enriquecidos, los nauplios se limpiaron con agua dulce para eliminar exceso de grasa (emulsión / enriquecimiento) y posible carga bacteriana. Seguidamente se procedió a la alimentación de las larvas con las cantidades adecuadas para cada tanque repartidas en dos tomas diarias. La cantidad de nauplios a repartir en las demás tomas se mantuvo a 4 °C con suficiente aireación para evitar el desenriquecimiento de la *Artemia*.

Desde el día de 20 dpe, los nauplios de *Artemia* enriquecidos fueron congeladas a – 20 °C en cubos de hielo (2x2cm) antes de ser distribuidos a las larvas, cada cubo contenía la cantidad de nauplios de *Artemia* necesaria para cada toma (mañana/tarde)

### 4.3. Cultivo larvario

Este experimento ha sido desarrollada en la sala de larvario de las instalaciones de la hatchery del IRTA-SCR (**fig.4.3.1.**), que se encuentra aislada de las demás áreas de la hatchery y que contiene 24 tanques cilíndricos de fondo plano, de fibra de vidrio, de 100 L cada uno. Todos los tanques estaban conectados a un modulo de recirculación de agua provisto de filtro mecánico de hasta 1µm, filtro biológico y filtro U.V a fin de mantener las condiciones físico-químicas y microbiológicas del agua (Carbó et al., 2003).



**Fig.4.3.1** Sala de cultivo larvario de las instalaciones de la hatchery de el IRTA-SCR

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 18 tanques (3 réplicas por cada tratamiento) pintados de color gris claro. Todos los tanques estaban provistos de entradas y salidas de agua y de aireadores. Tanto las tuberías como los aireadores contenían válvulas para regular la cantidad de agua y aire que entraba en cada tanque. La entrada de agua a los tanques estaba situada al nivel de la superficie. Los aireadores estaban situados junto al desagüe central (unos 5 cm por encima del desagüe inferior).



**Fig.4.3.2** .Tanque de la sala de larvario provisto de entrada de agua, desagüe central, malla y aireador.

El desagüe central de cada tanque consistía en un tubo cilíndrico que contenía una malla que no permitía la salida de toda la comida no ingerida por las larvas se cambió el tamaño de la malla de este desagüe desde el principio hasta el final del experimento con el fin de adaptar el proceso de alimentación con el desarrollo del cultivo. Al principio se utilizó una malla de 150  $\mu\text{m}$  para evitar que se escaparan el fitoplancton y las presas vivas (rotífero). A partir del día 10 post-eclosión (dpe) se cambió a mallas de 300  $\mu\text{m}$  para evitar que se escaparan los nauplius de *Artemia*.

Diariamente y durante el experimento las mallas fueron limpiadas con agua dulce para prevenir su obstrucción y el acúmulo de materia orgánica. A fin de mantener la limpieza de los tanques, el fondo de los tanques fue sifonado siempre que fue necesario.

Los huevos de lenguado utilizados en el presente experimento fueron donados por la empresa Stolt Sea Farm (en la Coruña; España). Estos fueron transportados desde

## Material y métodos

la empresa hasta el IRTA-SCR, en cubitainers de 25 L de volumen y eclosionaron durante el transporte, llegando a muestras instalaciones IRTA-SCR en el 1 dpe.



**Fig.4.3.3.** Cubitainers donde los huevos del lenguado fueron transportados hasta las instalaciones del IRTA.

Antes de transferir las larvas de los cubitainers a los tanques, se realizó un periodo previo de aclimatación térmica, lumínica, de las larvas, después de la aclimatación se repartieron las larvas en los 18 tanques de 100 l de fondo plano, a una densidad de 79 larvas l<sup>-1</sup> en cada tanque.

Unas horas antes de trasladar las larvas a los 18 tanques de 100 l, se añadió 4L (2-9 dpe) de la fitoplancton, una cantidad suficiente para dar una coloración verde suave al agua. Esta técnica denominada técnica de agua verde, es utilizada para mejorar el comportamiento depredador de las larvas (Naas et al. 1992), para disminuir el estrés de las mismas en el periodo en que no han abierto la boca y para al mismo tiempo alimentar el rotífero y evitar que este pierda sus características nutricionales y mejorar la calidad del agua (efecto bacteriostático) (Howell, 1979). Esta técnica fue utilizada hasta el día 9 dpe.

### 4.3.1. Condiciones físico –químicas durante el cultivo

El fotoperiodo ideal según Cañavate y Fernández-Díaz (1999) para el cultivo del lenguado sería de 16L: 8O, sin embargo por la repartición de las tomas de alimento enriquecido, el fotoperiodo utilizado fue de 14:10 (desde las 8h de la mañana hasta las 22h). Además de las luces existentes en la sala del cultivo larvario, los tanques estaban iluminados con lámparas colocadas por encima del centro de cada tanque. La intensidad de la luz en el centro de la superficie del agua de los tanques era de 500 lux.

Los parámetros ambientales utilizados comúnmente para el cultivo del lenguado senegalés son Temperatura  $20,02 \pm 1$  °C y salinidad de  $35 \pm 1$  gL<sup>-1</sup> (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dinis et al., 1999; Fernández-Díaz et al., 2001; Morais et al., 2004b; Cañavate et al., 2006). En este cultivo la temperatura del agua estuvo  $20,02 \pm 2,81$  °C y la salinidad del agua a  $35 \pm 0,95$  gL<sup>-1</sup>, el oxígeno disuelto cercano al 100% en saturación ( $7,45 \pm 1,26$  ppm) y el pH  $8,0 \pm 0,3$

Al día 2 dpe se mantuvo un caudal mínimo de  $0,04$  l min<sup>-1</sup> equivalente en los tanques a un 10% de renovación del agua, hasta la mitad del día, quedando después en circuito cerrado, Entre el día 3 y 4 se renovó por la noche, el 100% del agua de los tanques. A partir del día 5 dpe hasta el día 10 se subió la renovación diaria del agua a un 30 %, lo equivalente a un  $0,02$  l min<sup>-1</sup> el día 11 en adelante se mantuvo una renovación diaria de agua del 150 %.

### 4.3.2. Protocolo de alimentación larvaria

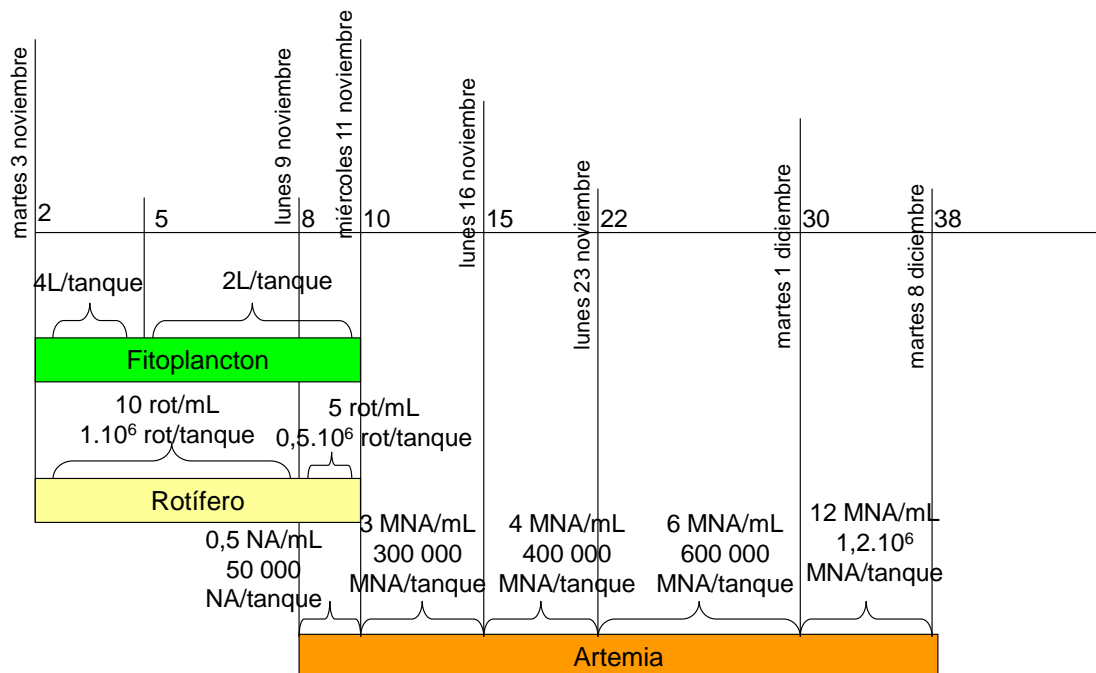
El régimen alimentario utilizado para el cultivo larvario del lenguado senegalés es muy variado, habiendo diversas pautas de alimentación para el cultivo larvario de esta especie. Teniendo en cuenta las pautas de alimentación utilizadas por Cañavate et al. (2006) y Villalta (2007) y teniendo en cuenta los estadios de desarrollo



del lenguado (Villalta, 2007) se ajustó la pauta de alimentación utilizada en este experimento según se encuentra representado en la **fig. 4.3.2.1**.

Rotíferos, fueron utilizados como primera presa en la secuencia de alimentación larvaria. Los rotíferos fueron añadidos a todos los tanques de cultivo a una densidad de  $1 \cdot 10^6$  rotíferos por tanque ( $10 \text{ rotíferos mL}^{-1}$ ) desde el día 2 dpe hasta el día 9dpe. La densidad de rotíferos fue ajustada 2 veces al día (10:00 y 15:00), a  $10 \text{ rotífero mL}^{-1}$  en cada toma. Del día 7dpe hasta el día 9 dpe se empezó a bajar la cantidad de rotífero en todos los tanques a  $5 \text{ rotífero mL}^{-1}$  ( $2,5 \text{ rotífero mL}^{-1}$  en cada toma) finalizando así el periodo de alimentación con rotíferos.

**\*6 enriquecedores comerciales sobre larvas de lenguado (*Solea senegalensis*)**



18 tanques de 100L, suministro 2 veces al día, NA : naupli de Artemia, MNA: métanauplio de Artemia

**Fig. 4.3.2.1.** Protocolo de la alimentación utilizado, para las larvas del lenguado senegalés.

Al aumentar el tamaño de la boca de las larvas, la alimentación de las larvas fue cambiando gradualmente. La utilización de los nauplios de *Artemia* como presa tiene como ventajas la rápida y sencilla disponibilidad de los nauplios, una buena digestibilidad, una cutícula delgada, el color llamativo y una buena palatabilidad (Monroig, 2006), si bien su valor nutricional no se ajusta a los requerimientos nutricionales de la larva y éstos han de ser enriquecidos con emulsiones especialmente diseñadas para este fin.

Al día 8dpe, se empezó a añadir *Artemia* a los tanques a una densidad de 0,5 nauplios de *Artemia* (NA) mL<sup>-1</sup>. Al día 9 dpe, se finalizó la alimentación con rotíferos, incrementándose la densidad de metanauplios a 3 MNA mL<sup>-1</sup> hasta el día 14 dpe. Del día 15 al 21 dpe, se incrementó la cantidad de 3MNA a 4MNA mL<sup>-1</sup>; del día 22 al 30 dpe se incrementó la cantidad de 4MNA a 6MNA mL<sup>-1</sup>; del día 31 al 38 dpe se incrementó la cantidad de 6MNA a 12 MNA mL<sup>-1</sup>.

La densidad de *Artemia* fue ajustada en los tanques de cultivo una media de 2 veces al día (10:00 y 15:00). Desde el día 20 dpe, la *Artemia* enriquecida se distribuyó en forma congelada. En esta etapa las larvas en su mayoría han completado su metamorfosis y la migración del ojo. Estas larvas son bentónicas y se alimentan de la *Artemia* que encuentran en el fondo del tanque.

### 4.3.3 Muestreos y análisis

#### 4.3.3.1 Longitud y peso seco

Al día 4, 10, 15, 22, 31 y 38 se tomaron muestras de 30-40 larvas de cada uno de los 18 tanques que se destinaron al análisis de la longitud estándar y del peso seco.

## Material y métodos

La longitud estándar, medida desde la extremidad anterior hasta la flexión del urostilo, se realizó mediante una lupa de disección (Nikon SMZ 800) y un analizador de imágenes (Análisis, SIS GMBH, Alemania).

Para calcular su peso seco, las larvas se lavaron con agua destilada para eliminar la sal y se dispusieron en cubre objetos de vidrio previamente pesados. Seguidamente se dispusieron los cubreobjetos con las larvas dentro de una estufa (UNB400, Memmert, Alemania) a 60°C durante 24 h. El peso seco se midió con una precisión de 1  $\mu$ g a con una balanza de precisión Sartorius.



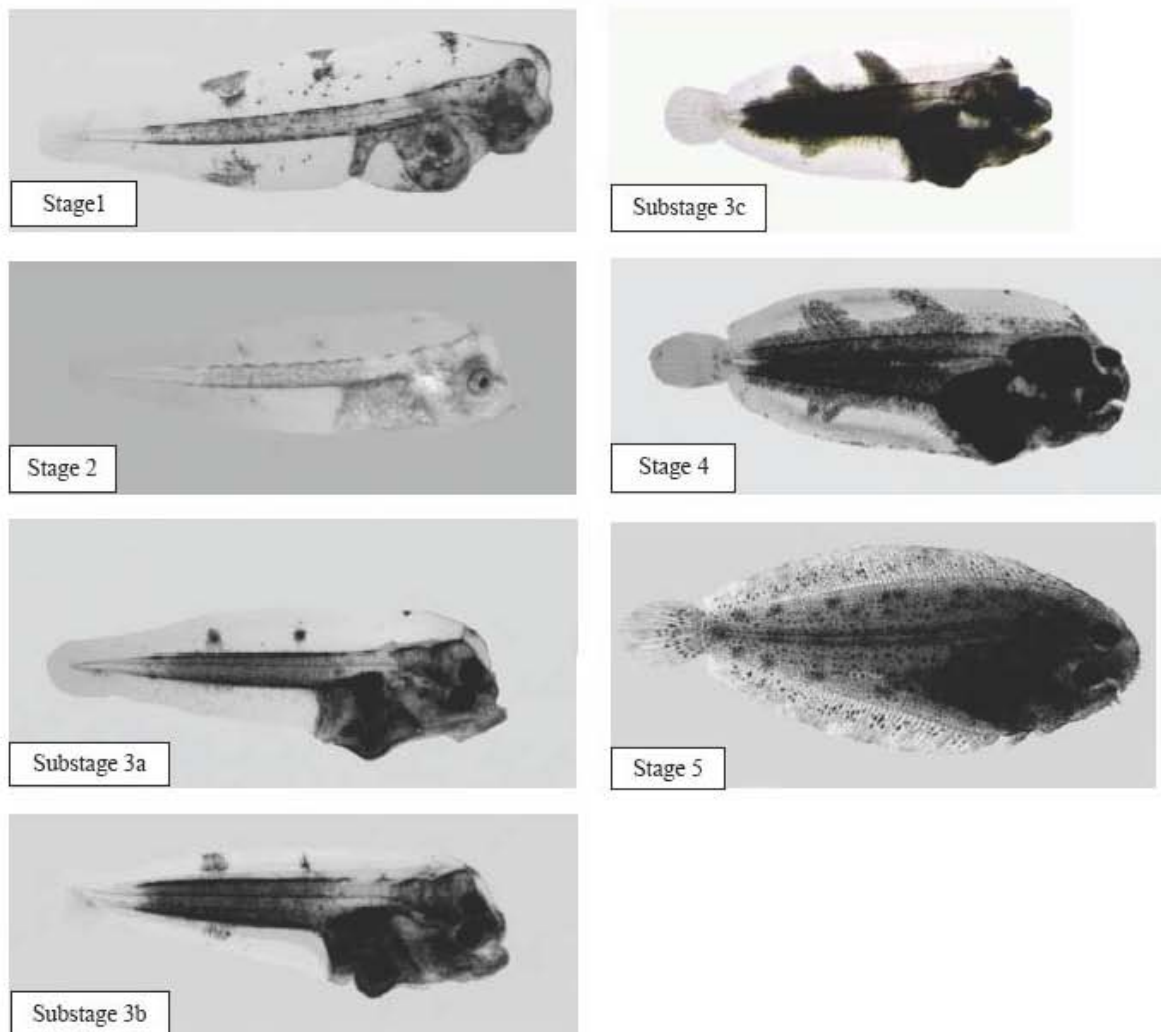
**Fig 4.3.3.1.1.** Imagen de los cubreobjetos usados para para calcular el peso seco de las larvas.

#### 4.3.3.2. Supervivencia

La supervivencia determinó al fin de la experiencia, mediante el conteo de los individuos supervivientes en relación al número inicial introducido en cada tanque y teniendo en cuenta las muestras tomadas a lo largo del experimento.

#### 4.3.3.3. Grado de migración del ojo (Metomorfosis)

Para evaluar el grado de migración del ojo se observó el estadio de desarrollo de 40 larvas por tratamiento, (10 larvas por cada tanque ) teniendo en cuenta la posición del ojo izquierdo durante su migración hacia el lado derecho (Villalta, 2005c).



**Fig 4.3.3.3.1.** Posición de los ojos durante las distintas fases de la metamorfosis de *S. senegalensis* (Villalta, 2007).

### 4.3.3.4. Bioquímica

#### 4.3.3.4.1. Extracción de lípidos totales

Al día 10 y 38 se tomaron muestras para su análisis bioquímico de *Artemia* enriquecida y larvas de lenguado. Las muestras fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se ha realizado el análisis bioquímico de las distintas emulsiones y de las presas vivas. Los lípidos de los tejidos y dietas fueron extraídos mediante solventes orgánicos. Los lípidos totales de las presas vivas enriquecidas y de las larvas fueron extraídos en C: M (2:1, v: v), según el método de Folch et al. (1957). Para realizar la transmetilación catalizada por ácido se siguió el método de Cristie (1982). El método seguido se describe a continua:

Se pesó 500 mg de cada una de las muestras con una aproximación de dos decimales y se añadieron 5 ml Cloroformo: Metanol, durante todo el proceso se mantuvieron los tubos sumergidos en hielo. Se homogenizaron las muestras durante 1 minuto a 2400 rpm, y sonicaron durante 30" con pulsos de 5" y se añadieron 5 ml Cloroformo: Metanol y 2,5 ml 0,88% KCl. Posteriormente, se agitaron enérgicamente y dejaron reposar durante 1h y se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Después de su centrifugación, se extrajo el sobrenadante y filtró el resto y se evaporó con nitrógeno gas. Se peso un vial de 2 ml para cada muestra y transfirió a los viales pesados y evaporó con nitrógeno. Después de evaporar, Los tubos se desecaron durante de la noche. Posteriormente, se pesaron los viales y calcularon los lípidos y conservaron C:M+BHT a una relación de 10 mg/ml.

### 4.3.3.4.2. Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases, para lo que es necesario obtener los esteres metílicos, este proceso, denominado transmetilación catalizada por ácido, se llevo a cabo mediante el método de Christie (1982).

Para la transmetilación, después de marcar tubos de 15 ml, se añadieron el estándar interno (1 mg/ml de 21:0, hexacosanoico) (500 µg de lípidos totales para 50 µg de estándar interno). Añadió 50 µl de la muestra de lípidos totales (conservada a una relación de 10 mg /ml).

Después de evaporar todo con nitrógeno gas, se añadió 1 ml de tolueno y añadieron 2 ml de una solución recién hecha de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% en metanol se mezclaron los tubos en un agitador y se llenó el espacio sobrante con nitrógeno gas, los tubos se pusieron en un bloque calentador a 50 °C durante toda la noche, periodo durante el cual tuvo lugar su transmetilación.

Posteriormente se añadió a cada tubo 2 ml de KHCO<sub>3</sub> al 2 % y 5 ml de hexano:eter (1:1) + BHT, y mezclándose durante 10-20 segundos. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2000 rpm.

La fase superior se transfirió a un tubo limpio y marcado usando una pipeta Pasteur, y se añadieron otros 5 ml de hexano:eter (sin BHT) mezclándose y centrifugándose a 2000 rpm . Los tubos se evaporaron con dos fases combinadas usando nitrógeno. los metiésteres con 0,5 ml de Cloroformo:Metanol+BHT y se transfirieron a un vial de 2 ml. y se evaporaron se recogieron los tubos con nitrógeno.

Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía gas-líquido en un cromatógrafo Thermo Finnigan TraceGC (Reino Unido) equipado con una columna capilar BPX70 (30m x 0,25 mm id; SGE, Reino Unido). Se utilizó un gradiente térmico

## Material y métodos

de dos fases, desde 50 °C (temperatura de inyección) a 150 °C incrementó a 40 °Cmin<sup>-1</sup>, posteriormente incrementó 2°C min<sup>-1</sup>, para detenerse durante 5 min a 225 °C. Como fase móvil se utilizó helio en flujo constante (1,1 ml min<sup>-1</sup>), tanto en la inyección como en el detector de ionización de llama a 250 °C. Los ácidos grasos fueron identificados mediante comparación con estándar (Supelco Inc., Madrid) y con aceite de pescado bien caracterizado. Fueron cuantificados por el programa Chromcard para Windows (Thermo Finnigan, Reino Unido) el cual utiliza promedios del factor de respuesta del estándar interno, 21:0.



**Fig.4.3.3.4.2.1.** Imagen del cromatógrafo Thermo Finnigan TraceGC usado para la cuantificación de los ácidos grasos.

### 4.3.3.5. Estudio de las deformaciones esqueléticas

El método más generalizado para el estudio de deformaciones esqueléticas en larvas de peces es el basado en la tinción selectiva de los tejidos óseos y cartilagosos por colorantes específicos como el rojo de alizarina S y el azul alcian, respectivamente. Así, el rojo de alizarina S tiñe la matriz mineralizada del hueso, mientras que el azul

## Material y métodos

alción colorea los condrocitos y matriz cartilaginosa. Larvas de 38 dpe, (30-40 por tanque) fueron coloreadas por la técnica de doble tinción con azul alción y rojo de alizarina (Darias et al., 2009). Según el protocolo que se detalla más abajo;

☒ **Fijación:** 30-40 larvas se muestrearon de cada tanque y fueron conservadas en formol al 40% durante al menos 24 horas.

☒ **Rehidratación:** Los individuos fueron rehidratados 2 veces en 50% etanol durante 15 minutos y después lavados en agua destilada 2 veces durante 5 minutos.

☒ **Tinción Cartílago:** Las larvas fueron coloreadas durante 60 minutos con una solución azul alción (80% alcohol al 95° y 20% ácido acético).

☒ **Neutralización:** El exceso de ácido fue neutralizada en los tejidos por incubación de muestras procesadas durante 3 minutos en una solución de etanol absoluto y 1 % KOH.

☒ **Rehidratación:** Las larvas se rehidrataron en una serie de baños de etanol (95, 70, 40,15%) dos veces cada 15 minutos finalmente las larvas se lavan en agua destilada dos veces (en 5 minutos). La pigmentación (melanina) de larvas fue eliminada en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 volumen de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 9 volumen de 1% KOH).

☒ **Tinción del hueso:** Las larvas fueron incubados en solución de rojo de alizarina 4 ml de solución de rojo alizarina (0,5 g de alizarina /100 ml KOH) + 200 ml 1% KOH durante de un tiempo variable, dependiendo del grado de osificación.

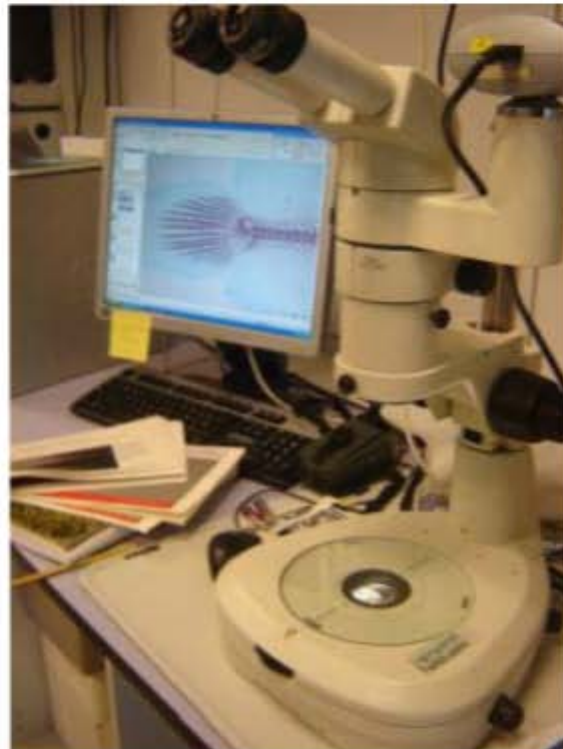
☒ **Lavado:** Las larvas se lavaron con agua destilada y posteriormente con una solución de 1% KOH hasta la extracción total de Rojo Alizarina de los tejidos blandos. El tiempo de incubación varió según el grado de osificación de las larvas.

☒ **Deshidratación:** Las larvas se lavaron en serás incrementales glicerol+ 1% KOH (40% Glycerol+ 60% 1 KOH; 70 % Glycerol + 30% 1 KOH ).



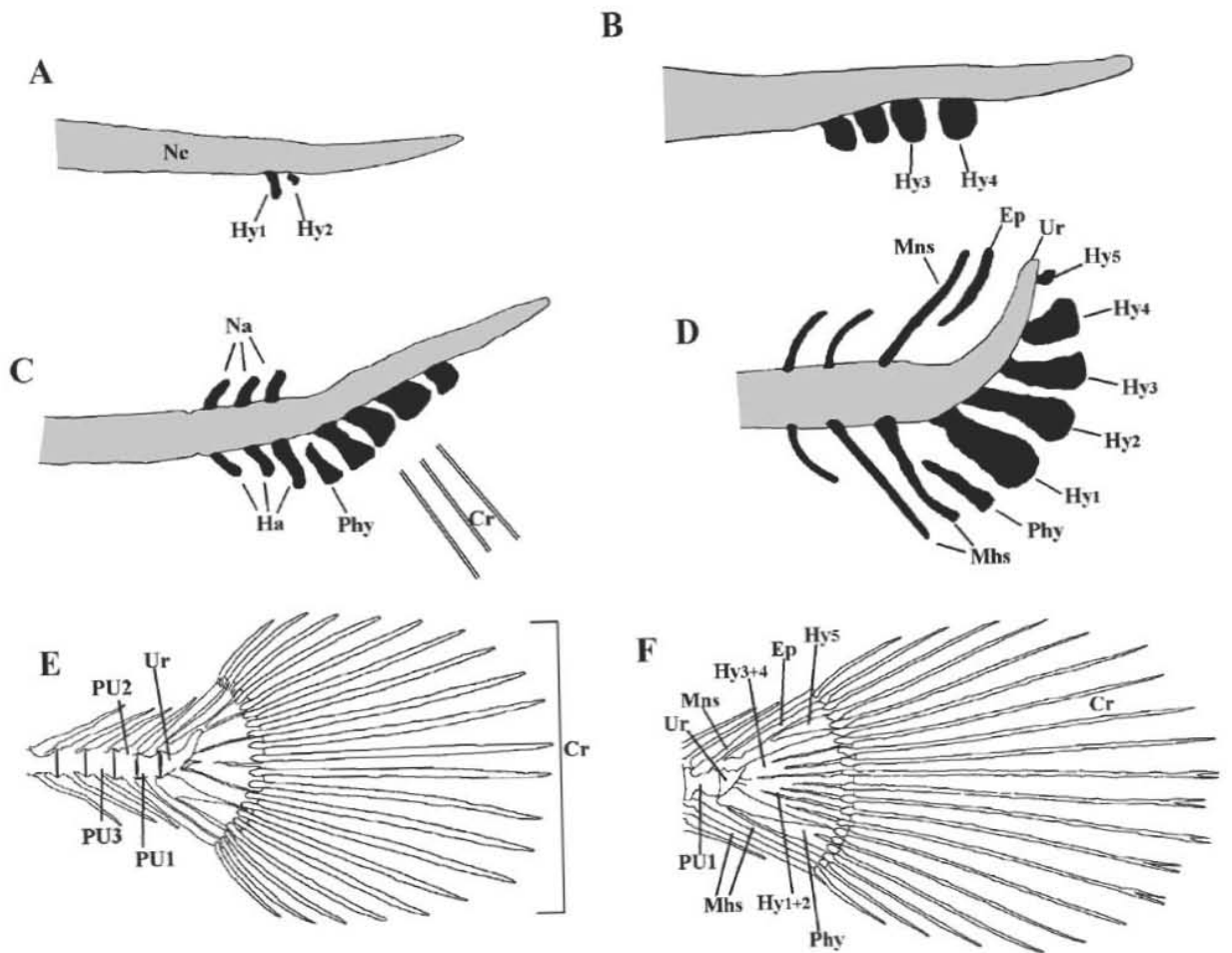
✍ **Conservación:** Finalmente fueron almacenadas en una solución de 100% glicerina.

Posteriormente las larvas se observaron con un microscopio binocular (Nikon SMZ 800) para determinar cualquier anomalía y se fotografiaron.



**Fig. 4.3.3.5.1.** Un microscopio binocular (Nikon SMZ 800) y un analizador de imágenes (Análisis, SIS GMBH, Alemania).

En este trabajo se tubo en cuenta la terminología anatómica relacionada con las estructuras esqueléticas aplicada por Gavaia et al. (2002) tal y como se muestra en la figura 4.3.3.5.2.



**Fig. 4.3.3.5.2.** Representación esquemática del desarrollo o del complejo caudal en lenguado senegalés. (A) 13 dpe - 4,4 mm Lst) ; ( B) 15 dpe- 4,55 mm Lst; (C) 18 dpe- 4,7 mm Lst; (D) 18 dpe- 5,6 mm Lst; (E) 34 dpe (7,8 mm Lst); (F) juvenil de seis meses- 59,2 Lst. **Cr:** radius caudales; **EP:** Epural; **Hy:** Hypural; **LSt :**longitud estándar; **Mhs:**Espinas Hemales Modificadas; **Nc:** Notocorda; **Phy:** Parahypural; **PU:** Vértebra preural; **Ur;** Urostilo (Imagen extraída de Gavaia et al., 2002).

### 4.3.3.6. Análisis de las enzimas digestivas y capacidad digestiva

En los días 10, 30 y 38 se tomaron larvas para el análisis de enzimas digestivos (páncreas e intestino). En el primer día se tomaron aproximadamente 200 larvas por tanque y en los demás días 50 larvas por tanque. Las muestras se lavaron con agua destilada para remover el exceso de sal y se congelaron en seguida a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta un posterior análisis.

Las larvas fueron diseccionadas (en una placa de vidrio sobre hielo) afín de obtener la máxima cantidad de intestino y la mínima de otros tejidos, eliminando cabeza y cola de las larvas. Con la ayuda del Ultra-Turrax T25 basic, IKA© / Werke Utra turrax (Ika, Germany), las muestras congeladas fueron homogenizadas durante 5 min en Tris-Mannitol (50mM) a  $4^{\circ}\text{C}$ , HCL (2mM), pH=7 (volumen = g tejido homogenizado x 30). Se aliquotaron 1,5 ml del homogenado de cada muestra, para procesar los enzimas pancreáticos (tripsina y amilasa). Se sonicaron estas muestras (1min, Vibra-cell, Sonics, USA) y según la ecuación Volumen de  $\text{CaCl}_2 = (\text{Volumen de mannitol} - 1) \times 0,12$  se añadió una cantidad de  $\text{CaCl}_2$  (0,1M) variable a las muestras con el fin de proceder a la purificación del borde en cepillo de los enterocitos.

Estos enzimas de los bordes del cepillo (Fosfatasa Alcalina y Aminopeptidasa) de los enterocitos se purificaron según el método desarrollado por Crane et al. (1979). La lectura de la actividad de todos los enzimas se realizó en un espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-Tek) utilizando microplacas Nunclon (48 de hondo plano). La actividad de la tripsina se cuantificó utilizando 0,1M N -Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA, Sigma B4875) como sustrato y como buffer el Tris-HCl 50mM,  $\text{CaCl}_2$  20 mM, pH 8.2. Una unidad de tripsina por ml corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  BAPNA hidrolizado por min y por ml de extracto de enzima leído a 407nm (Holm et al., 1988).

## Material y métodos

La actividad de la amilasa se cuantificó según el método de Métais y Bieth (1968) utilizando el almidón disuelto en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH 7.4. La actividad de la amilasa (U) fue definida como la cantidad de mg de almidón hidrolizado durante 30 min y por ml de tejido homogenizado a 37 °C a 580 nm.

La actividad de la aminopeptidasa se midió utilizando el sustrato 0,1 M L-leucine-p-nitroanilidina (Sigma, L9125) y tampón fosfato 80 mM (pH = 7.0). Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como 1µg de nitroanilida liberado por min y ml del homogenado del borde del cepillo de los enterocitos a 410nm (Maroux et al., 1973).

La actividad de la fosfatasa alcalina se cuantificó a 37°C utilizando el *p*-nitrophenylphosphate (PNPP, Merck 6850) en un tampón  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30 mM. Una unidad de actividad de la fosfatasa alcalina corresponde a 1 µmol PNPP hidrolizado por min y por ml del homogenado del borde del cepillo, a 407nm (Bessey et al., 1946). La actividad de la leucina-alanina peptidasa se cuantificó a 37°C utilizando el Horseradish peroxidase (Sigma P6782), L-aminooxidase (Sigma A5147), o-dianisidina (Sigma D9143) y substrat leucina-alanina (Leu-ala, Sigma L8000) en un tampón Tris-HCl 100mM; pH=8.0 por ml de tejido homogenizado a 530 nm.( Nicholson and Kim 1975).

La actividad de la lipasa se cuantificó según el método de Iijima et al., (1998) utilizando el *p*-nitrophenyl myristate (Sigma B4875) en un tampón Tris-HCl 0,25 mM; pH= 9.0 por ml de tejido homogenizado a 405 nm. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de serum bovino (BSA) (SIGMA) como estándar.

## Material y métodos

La lectura del contenido en proteína fue realizada en un espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-Tek) utilizando microplacas Nunclon (48 de fondo plano). La actividad de los enzimas se expresó como actividad específico, en mili-unidades por miligramos de proteína (mU/mg proteína).



**Fig.4.3.3.6.2.** Espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-Tek) utilizado para la cuantificación de las enzimas pancreáticas y intestinales.

### 4.3.3.7 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se han llevado a cabo con el paquete estadístico (Sigma Stat, 3.1). Todos los datos fueron analizados para su normalidad y homogeneidad de varianzas. Todos los datos se evaluaron utilizando ANOVA de un factor. Cuando la ANOVA detectó diferencias significativas entre grupos, estas fueron evaluadas con un test de Tukey y de Fisher (para las proporciones). La significancia estadística de las diferencias se estableció a un nivel de 5% ( $P < 0,05$ ) para cada grupo de comparaciones.

## **5. RESULTADOS**

**5.1 Composición lipídica de las presas vivas**

La composición bioquímica de la *Artemia* enriquecida con las distintas emulsiones se muestra en la tabla 5.1.1. Sin embargo, la composición lipídica de los rotíferos no se muestra debido a que se utilizaron como alimento durante muy pocos días y se enriquecieron de forma similar cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de lípidos totales de los nauplios enriquecidos de *Artemia* con las distintas emulsiones experimentales ANOVA, ( $P=0,224$ ). No se encontraron diferencias significativas en el contenido de los ácidos grasos saturados y de HUFA n-6 de los nauplios enriquecidos con las distintas emulsiones experimentales (ANOVA,  $P > 0,05$ ). Se encontraron diferencias significativas en las proporciones de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), debido a las diferencias entre los contenidos de ácido oleico (OA) (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

También se encontraron diferencias significativas en el total de HUFA n-3 entre los nauplios enriquecidos de *Artemia* con RP y el resto de emulsiones y al alto contenido ácido linolénico (LNA) presente en este grupo (ANOVA,  $P < 0,05$ ). El contenido de EPA de la *Artemia* enriquecida fueron mayores en el grupo ES y se encontraron diferencias significativas entre de los grupos También se encontraron diferencias significativas en DHA y ARA entre la *Artemia* enriquecida con MG y los cinco grupos experimentales (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Las emulsiones utilizada permiten evaluar el efecto combinado de DHA/EPA unido a niveles incrementales de total n-3 PUFA tal y como muestran los resultados de la analítica realizada sobre la presa viva.

## Resultados

	ES	ES/2	RP	AGG	AGD	MG
Total lípidos (mg·g <sup>-1</sup> DW)	219,8±17,4	175,3±44,6	174,7±17,3	184,4±17,0	202,9±1,3	159,6±8,3
Total (mg·g <sup>-1</sup> DW)	155,9±54,8	112,2±20,0	104,9±15,6	124,0±43,0	106,3±6,0	116,1±24,1
14:0	0,7±0,1	0,3±0,1	0,7±0,5	0,8±0,4	0,6±0,4	0,6±0,3
16:0	9,9±0,4	8,3±0,9	12,2±1,2	10,3±1,7	9,5±3,6	10,7±0,4
18:0	4,2±0,2	4,3±0,4	4,7±0,8	4,5±0,2	4,2±1,5	3,8±0,7
Total saturated	14,9±0,3	13,0±1,2	17,8±1,2	15,9±2,6	14,6±5,4	15,1±0,7
16:1n-7	2,1±0,6	1,1±0,1	1,0±0,9	1,1±0,3	1,6±0,6	1,1±0,2
18:1n-9	33,3±2,6 <sup>ab</sup>	50,8±2,0 <sup>a</sup>	20,2±7,0 <sup>b</sup>	26,2±10,1 <sup>ab</sup>	27,7±19,0 <sup>ab</sup>	17,8±6,1 <sup>b</sup>
18:1n-7	0,0±0,0	0,0±0,0	3,6±6,2	4,1±7,0	0,0±0,0	3,1±5,4
20:1n-9	2,5±0,2 <sup>a</sup>	1,7±0,2 <sup>ab</sup>	1,2±0,1 <sup>b</sup>	1,1±0,2 <sup>b</sup>	1,5±0,7 <sup>ab</sup>	1,2±0,2 <sup>b</sup>
Total monounsaturated	38,8±3,7 <sup>ab</sup>	54,1±1,6 <sup>a</sup>	26,5±1,9 <sup>b</sup>	32,7±3,2 <sup>ab</sup>	30,9±17,7 <sup>b</sup>	23,5±2,4 <sup>b</sup>
18:2n-6	8,28±0,04 <sup>a</sup>	6,3±0,5 <sup>ab</sup>	7,6±0,4 <sup>ab</sup>	5,2±1,0 <sup>b</sup>	6,9±1,9 <sup>ab</sup>	5,5±0,5 <sup>ab</sup>
18:3n-6	0,56±0,03	0,3±0,2	0,4±0,2	0,5±0,2	0,6±0,5	0,4±0,1
20:4n-6	0,5±0,1 <sup>cd</sup>	0,3±0,1 <sup>cd</sup>	1,4±0,3 <sup>a</sup>	0,7±0,1 <sup>bc</sup>	0,2±0,2 <sup>d</sup>	1,1±0,2 <sup>ab</sup>
22:5n-6	0,1±0,07	0,0±0,0	2,8±2,5	2,2±1,9	0,04±0,04	3,7±3,2
Total n-6 PUFA	9,5±0,2	7,0±0,4	12,3±2,3	8,6±2,3	7,8±2,6	10,8±3,7
18:3n-3	18,9±1,8	17,4±2,3	20,5±3,4	24,1±6,1	25,1±5,5	21,4±2,1
18:4n-3	2,3±0,3	1,92±0,02	2,4±0,3	2,9±0,6	3,4±1,0	2,9±0,4
20:4n-3	0,4±0,6	0,3±0,3	0,5±0,4	0,6±0,5	0,4±0,4	0,8±0,1
20:5n-3	7,6±0,6 <sup>a</sup>	3,1±0,9 <sup>c</sup>	5,1±0,6 <sup>b</sup>	3,1±0,4 <sup>cb</sup>	3,7±1,2 <sup>cb</sup>	4,9±0,4 <sup>cb</sup>
22:5n-3	1,4±0,3	1,6±1,8	1,8±2,6	1,2±2,0	1,9±2,7	1,8±2,4
22:6n-3	5,5±1,5 <sup>cd</sup>	1,3±0,5 <sup>d</sup>	11,5±1,0 <sup>b</sup>	9,5±0,9 <sup>bc</sup>	11,8±2,7 <sup>b</sup>	16,9±2,0 <sup>a</sup>
Total n-3 PUFA	36,5±3,5 <sup>ab</sup>	25,7±3,2 <sup>b</sup>	42,9±1,6 <sup>a</sup>	42,5±4,6 <sup>a</sup>	46,4±9,5 <sup>a</sup>	50,4±2,3 <sup>a</sup>
Total polyunsaturated	46,0±3,7 <sup>ab</sup>	32,7±2,9 <sup>b</sup>	55,3±2,8 <sup>a</sup>	21,1±5,9 <sup>a</sup>	54,1±12,0 <sup>a</sup>	61,1±2,3 <sup>a</sup>
(n-3)/(n-6)	3,9±0,3	3,7±0,6	3,6±0,7	5,2±1,5	6,2±0,9	5,2±2,4
DHA/EPA	0,7±0,1 <sup>c</sup>	0,4±0,1 <sup>c</sup>	2,3±0,3 <sup>b</sup>	3,0±0,1 <sup>a</sup>	3,3±0,3 <sup>a</sup>	3,5±0,3 <sup>a</sup>
ARA/DHA	0,1±0,0 <sup>bc</sup>	0,22±0,04 <sup>a</sup>	0,12±0,01 <sup>b</sup>	0,08±0,01 <sup>bc</sup>	0,01±0,01 <sup>d</sup>	0,07±0,01 <sup>cd</sup>
ARA/EPA	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,09±0,02 <sup>b</sup>	0,3±0,1 <sup>a</sup>	0,23±0,02 <sup>a</sup>	0,04±0,03 <sup>b</sup>	0,23±0,03 <sup>a</sup>

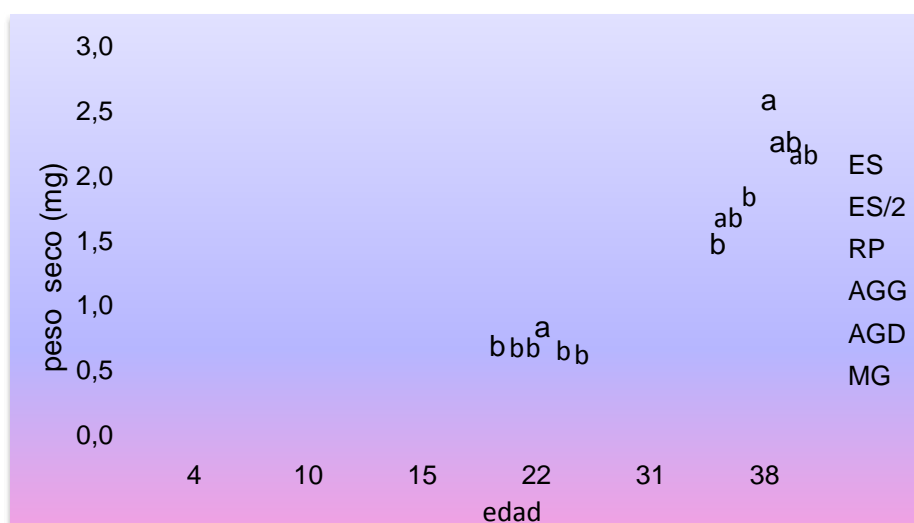
**Tabla 5.1.1** Resultados del análisis bioquímico de lípidos y ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida (% TFA) (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



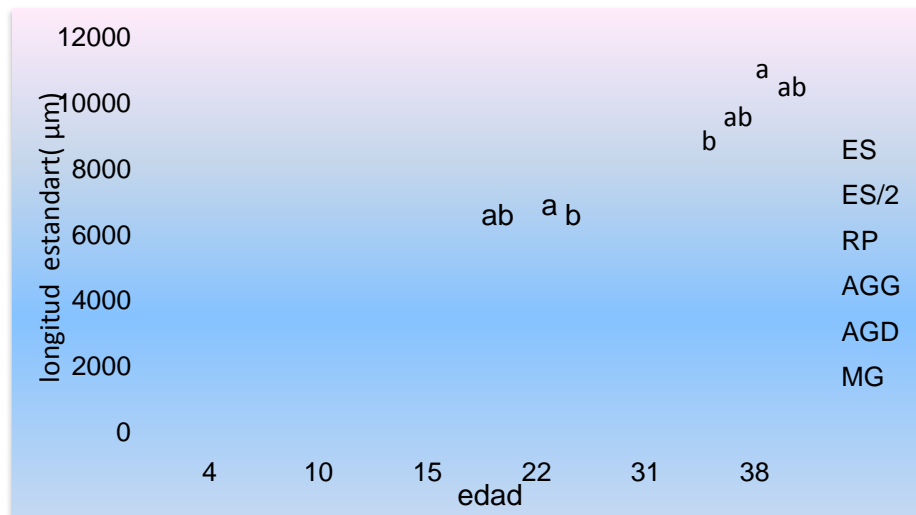
## 5.2 Efecto de la dieta sobre las larvas lenguado

### 5.2.1. Crecimiento

Los resultados de crecimiento se muestran **figura 5.2.1.1.** y **5.2.1.2.** Después del día de 15, se observó un crecimiento mayor, tanto en talla como en peso seco, en las larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión Agua Grow Gold. Se observaron diferencias significativas en y crecimiento en peso seco entre de las distintas 6 emulsiones (ES, ES/2, RP, AGG, AGD, MG).



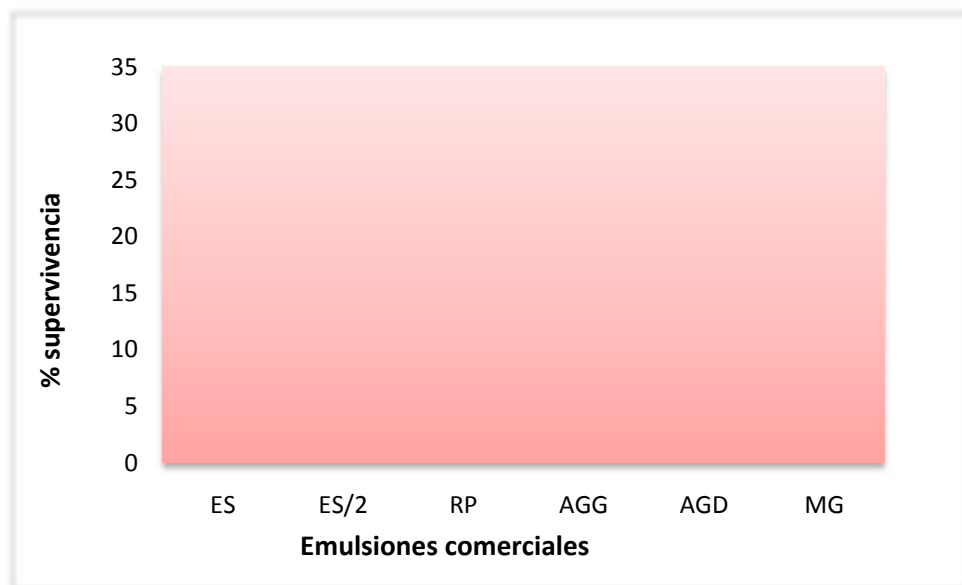
**Fig. 5.2.1.1.** Efecto de las distintas emulsiones en el crecimiento en peso seco de las larvas del lenguado senegalés. Los datos muestran la Media  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las emulsiones en el estudio (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



**Fig. 5.2.1.2.** Efecto de las distintas emulsiones en el crecimiento en talla (longitud estándar) de las larvas del lenguado senegalés. Los datos muestran la Media  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las emulsiones en el estudio (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 5.2.2. Supervivencia

En la supervivencia, no se han detectado diferencias estadísticas significativas (ANOVA,  $P > 0,05$ ) entre los seis distintas emulsiones comerciales. En la figura **5.2.2.1.** Se refleja la supervivencia media de las larvas alimentadas con las distintas emulsiones comerciales.



**Fig. 5.2.2.1.** Efecto de las distintas emulsiones sobre la supervivencia las larvas del lenguado senegalés. Los datos muestran la Media  $\pm$  SD calculadas a partir de 3 replicas por tratamiento (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

### 5.2.3. Efectos de la dieta sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de las larvas

La composición en ácidos grasos de las larvas reflejó la composición de la dieta con la que se alimento durante el periodo experimental (Tabla 5.2.3.1.). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos, ni en la cantidad de lípidos totales ni en la cantidad de ácidos grasos totales de las larvas. ANOVA,  $P > 0,05$ . Al igual que en la presa viva la composición en ácidos grasos de las larvas reflejó la composición de las dietas. Se encontraron diferencias significativas en el total de MUFA, debido a las diferencias entre los contenidos de ácido oleico (OA) ANOVA,  $P < 0,05$ . El grupo de ES/2 mostró un contenido significativamente mayor ácido oleico

## Resultados

de que los otros cinco grupos, siendo el grupo de MG el que mostró un contenido menor de este ácido graso. También se encontraron diferencias significativas en el total de PUFA n-6 entre el grupo ES/2 y los cinco grupos, debido al alto contenido ácido linoleico (LA) presente en este grupo ANOVA,  $P < 0,05$ . Los contenidos de EPA y ARA de las larvas fueron mayores en el grupo ES y se encontraron diferencias significativas entre de los grupos ANOVA,  $P < 0,05$ . El grupo de MG mostró un contenido significativamente mayor de DHA que otros cinco grupos, siendo el grupo de ES/2 el que mostró un contenido menor de este ácido graso y se encontraron diferencias significativas entre de los grupos ANOVA,  $P < 0,05$ . También se encontraron diferencias significativas en el total de PUFA n-3 entre el grupo ES/2 y los cinco grupos ANOVA,  $P < 0,05$ . El grupo de MG el que mostró un contenido mayor de en el total de PUFA n-3 debido al alto contenido DHA presente en este grupo ANOVA,  $P < 0,05$ .

## Resultados

**Tabla 5.2.3.1** Composición en porcentaje de ácidos grasos totales de las larvas de lenguado senegalés al final del experimento. Los superíndices (a, b, c, d) marcan las diferencias significativas entre las distintas emulsiones del experimento (38 dph) (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

	Inicial	ES	ES/2	RP	AGG	AGD	MG
Total lipids (mg·g <sup>-1</sup> DW)	37,5	67,3±17,0	88,3±11,3	79,0±8,6	97,9±5,8	93,4±11,1	86,6±7,5 <sup>d</sup>
Total FA (mg·g <sup>-1</sup> DW)	20,7	34,7±10,0	53,5±10,3	36,9±9,6	41,6±3,0	49,0±9,7	41,9±2,3
14:0	0,7	0,4±0,1 <sup>bc</sup>	0,3±0,0 <sup>c</sup>	0,6±0,1 <sup>ab</sup>	0,6±0,1 <sup>a</sup>	0,5±0,0 <sup>ab</sup>	0,6±0,0 <sup>a</sup>
16:0	18,1	10,4±1,1 <sup>bc</sup>	8,6±0,1 <sup>c</sup>	12,8±1,1 <sup>a</sup>	11,4±0,4 <sup>ab</sup>	10,0±1,1 <sup>bc</sup>	11,5±0,6 <sup>ab</sup>
18:0	7,6	5,8±0,5 <sup>bc</sup>	4,7±0,4 <sup>d</sup>	7,3±0,4 <sup>a</sup>	6,4±0,2 <sup>ab</sup>	5,1±0,4 <sup>cd</sup>	6,2±0,1 <sup>b</sup>
Total saturated	26,7	16,9±1,7 <sup>bc</sup>	13,6±0,3 <sup>c</sup>	20,7±1,6 <sup>a</sup>	18,5±0,6 <sup>ab</sup>	16,1±2,0 <sup>bc</sup>	18,4±0,5 <sup>ab</sup>
16:1n-7	3,0	1,0±0,1	1,3±0,8	0,7±0,0	0,7±0,2	0,7±0,1	0,6±0,1
18:1n-9	17,0	32,1±4,9 <sup>bc</sup>	42,4±4,9 <sup>a</sup>	24,5±0,7 <sup>cd</sup>	30,3±1,2 <sup>bc</sup>	34,8±1,2 <sup>ab</sup>	21,5±1,6 <sup>d</sup>
20:1n-9	1,9	2,8±0,3 <sup>a</sup>	2,7±0,3 <sup>a</sup>	1,8±0,4 <sup>ab</sup>	2,0±0,1 <sup>ab</sup>	2,1±0,3 <sup>ab</sup>	1,6±0,7 <sup>b</sup>
Total monounsaturated	21,9	35,9±5,1 <sup>b</sup>	46,4±4,3 <sup>a</sup>	27,1±0,6 <sup>cd</sup>	33,0±1,2 <sup>bc</sup>	37,6±1,5 <sup>b</sup>	23,7±1,5 <sup>d</sup>
18:2n-6	2,9	7,9±1,0 <sup>ab</sup>	9,2±0,1 <sup>a</sup>	7,9±0,4 <sup>ab</sup>	5,8±0,8 <sup>c</sup>	6,8±0,4 <sup>bc</sup>	5,4±0,4 <sup>c</sup>
18:3n-6	0,2	0,6±0,1 <sup>a</sup>	0,4±0,0 <sup>b</sup>	0,5±0,1 <sup>ab</sup>	0,6±0,0 <sup>a</sup>	0,6±0,1 <sup>a</sup>	0,5±0,0 <sup>ab</sup>
20:4n-6	3,0	1,1±0,2 <sup>c</sup>	0,9±0,2 <sup>cd</sup>	3,3±0,1 <sup>a</sup>	2,1±0,1 <sup>b</sup>	0,5±0,1 <sup>d</sup>	3,0±0,1 <sup>a</sup>
22:5n-6	0,7	0,3±0,2 <sup>c</sup>	0,1±0,1 <sup>c</sup>	4,6±0,6 <sup>b</sup>	3,8±0,1 <sup>b</sup>	0,1±0,2 <sup>c</sup>	5,6±0,4 <sup>a</sup>
Total n-6 PUFA	7,2	10,2±1,3 <sup>cd</sup>	10,8±0,3 <sup>bc</sup>	16,6±1,0 <sup>a</sup>	12,5±0,6 <sup>b</sup>	8,1±0,7 <sup>d</sup>	14,9±0,6 <sup>a</sup>
18:3n-3	0,5	14,3±1,6	15,5±1,1	12,6±1,2	15,5±0,8	15,4±1,1	14,5±0,6
18:4n-3	0,1	1,6±0,3 <sup>ab</sup>	1,3±0,2 <sup>ab</sup>	1,1±0,2 <sup>b</sup>	1,7±0,2 <sup>ab</sup>	1,8±0,1 <sup>a</sup>	1,6±0,2 <sup>ab</sup>
20:4n-3	0,3	0,8±0,1 <sup>a</sup>	0,7±0,1 <sup>ab</sup>	0,5±0,1 <sup>b</sup>	0,8±0,1 <sup>a</sup>	0,7±0,0 <sup>ab</sup>	0,7±0,0 <sup>ab</sup>
20:5n-3	4,9	5,1±0,7 <sup>a</sup>	3,4±0,5 <sup>b</sup>	3,0±0,2 <sup>b</sup>	2,3±0,2 <sup>b</sup>	2,6±0,4 <sup>b</sup>	3,2±0,3 <sup>b</sup>
22:5n-3	4,2	4,0±0,7 <sup>a</sup>	2,1±0,2 <sup>b</sup>	2,0±0,4 <sup>b</sup>	1,7±0,3 <sup>b</sup>	1,5±0,1 <sup>b</sup>	1,9±0,1 <sup>b</sup>
22:6n-3	33,1	10,4±1,9 <sup>c</sup>	5,6±1,4 <sup>d</sup>	15,3±0,7 <sup>b</sup>	12,9±1,5 <sup>bc</sup>	15,1±1,7 <sup>b</sup>	20,0±1,6 <sup>a</sup>
Total n-3 PUFA	43,2	36,2±4,8 <sup>ab</sup>	28,6±3,5 <sup>b</sup>	34,6±2,1 <sup>ab</sup>	34,9±2,2 <sup>ab</sup>	37,2±3,1 <sup>ab</sup>	42,0±2,1 <sup>a</sup>
Total polyunsaturated	50,3	46,4±6,1 <sup>b</sup>	39,4±3,8 <sup>b</sup>	51,3±2,3 <sup>ab</sup>	47,5±1,6 <sup>ab</sup>	45,2±3,7 <sup>b</sup>	56,9±2,0 <sup>a</sup>
(n-3)/(n-6)	6,0	3,6±0,0 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>cd</sup>	2,1±0,2 <sup>d</sup>	2,8±0,3 <sup>c</sup>	4,6±0,3 <sup>a</sup>	2,8±0,2 <sup>c</sup>
DHA/EPA	6,8	2,0±0,1 <sup>c</sup>	1,7±0,2 <sup>c</sup>	5,1±0,4 <sup>b</sup>	5,6±0,2 <sup>ab</sup>	5,8±0,6 <sup>ab</sup>	6,2±0,5 <sup>a</sup>
ARA/DHA	0,1	0,1±0,0 <sup>c</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>	0,03±0,0 <sup>d</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>
ARA/EPA	0,6	0,2±0,0 <sup>c</sup>	0,3±0,0 <sup>c</sup>	1,1±0,1 <sup>a</sup>	0,9±0,1 <sup>b</sup>	0,2±0,0 <sup>c</sup>	0,9±0,1 <sup>b</sup>

5.2.4. Metamorfosis

Las etapas de migración del ojo se determinaron a partir de 10 hasta 38dph de 10 larvas por tanque calculándose el índice de la migración del ojo (IEM). No se han detectado diferencias significativas entre de los resultados ANOVA,  $P>0,05$ . Los resultados se presentaron en la figura 5.2.4.1.

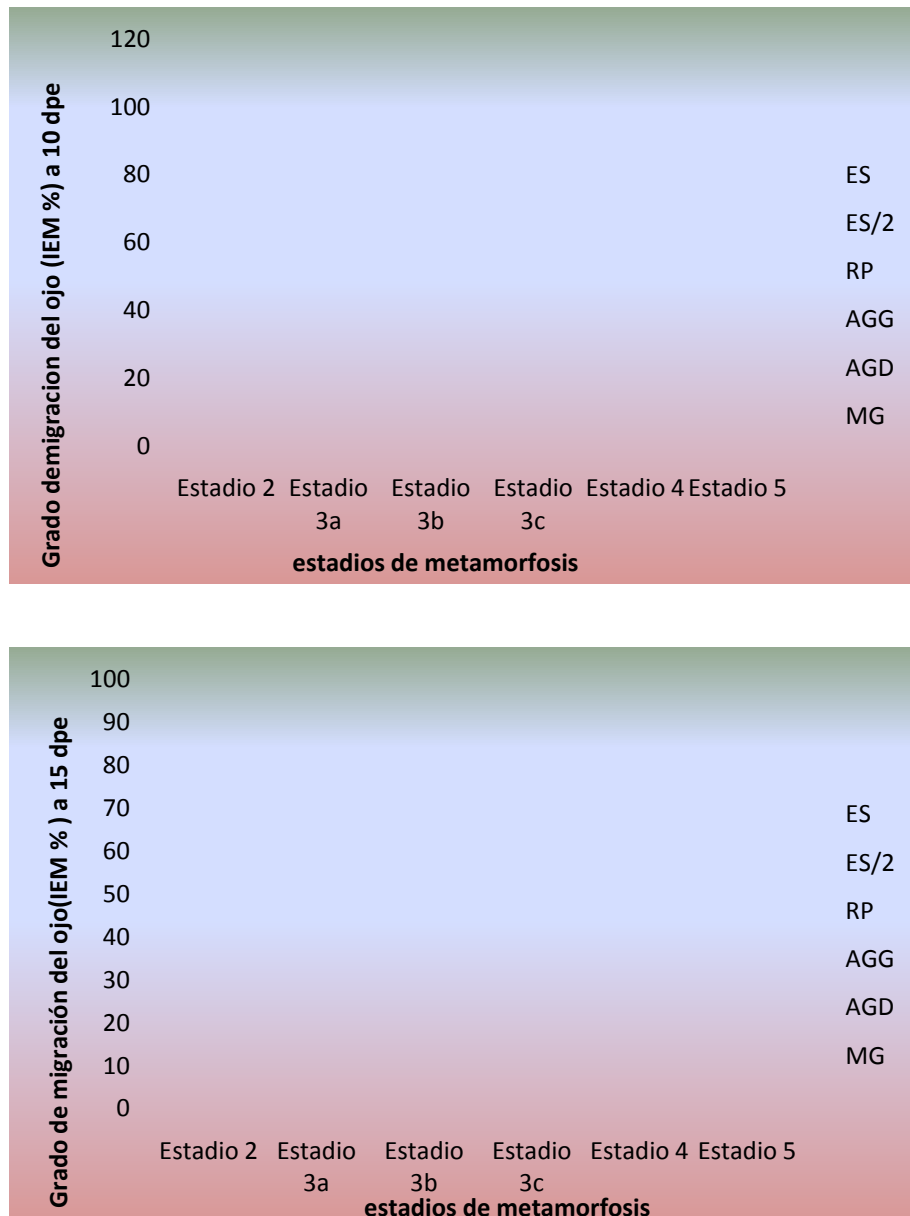


Figura 5.2.4.1. Índice de migración del ojo durante el proceso de metamorfosis en las larvas según las distintas emulsiones 10 dpe; 15 dpe; 22 dpe; 31 dpe y 38 dpe estadios de metamorfosis (ANOVA,  $P>0,05$ ).



**Figura 5.2.4.1. continuación.** Índice de migración del ojo durante el proceso de metamorfosis en las larvas según las distintas emulsiones 10 dpe; 15 dpe; 22 dpe; 31 dpe y 38 dpe estadios de metamorfosis.



**Figura 5.2.4.1. continuacion.** Índice de migración del ojo durante el proceso de metamorfosis en las larvas según las distintas emulsiones 10 dpe; 15 dpe; 22 dpe; 31 dpe y 38 dpe estadios de metamorfosis.

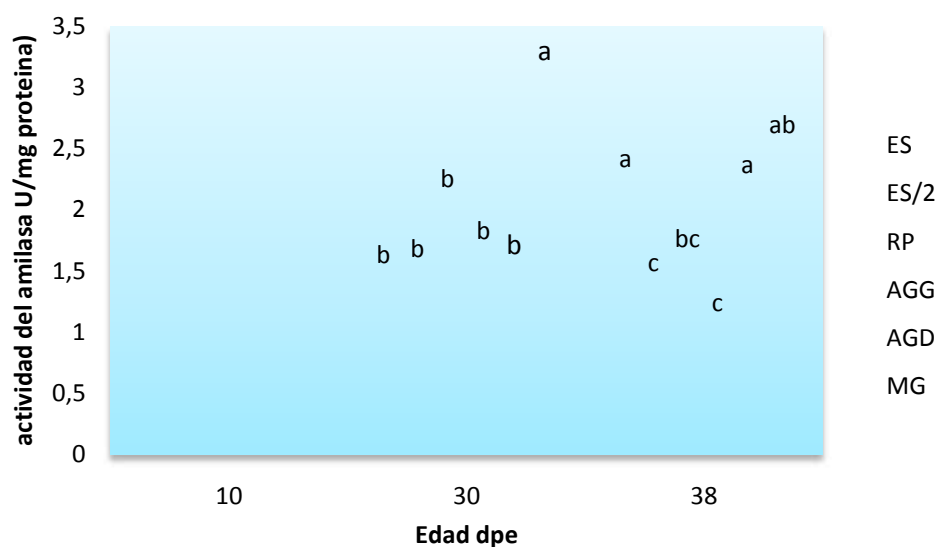


## 5.2.5 Desarrollo y madurez del sistema digestivo

### 5.2.5.1 Enzimas pancreáticas

#### 5.2.5.1.1 Amilasa

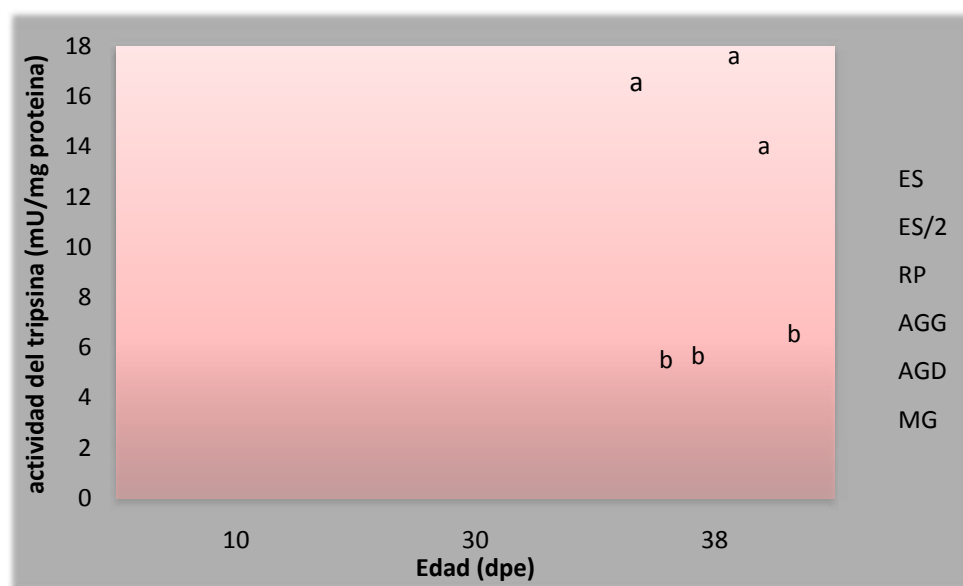
La actividad específica de amilasa (U/mg Proteína) a nivel de los grupos AGG y ES/2 se mantienen constantes con la edad respectivamente al día 10, 30 y 38. Dicha actividad aumentó a los días 10 y 30 en los grupos MG y RP, mientras que disminuyó al 38 dpe. Sin embargo en los grupos ES y AGD, la actividad disminuyó a los días 10 y 30 dpe y aumentó al 38 dpe. (Fig 5.2.5.1.1.1). Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en cada día de muestreo, se detectaron diferencias estadísticas en los días 30 y 38 (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



**Fig. 5.2.5.1.1.1** Evolución de la actividad de la amilasa (U/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 5.2.5.1.2 Tripsina

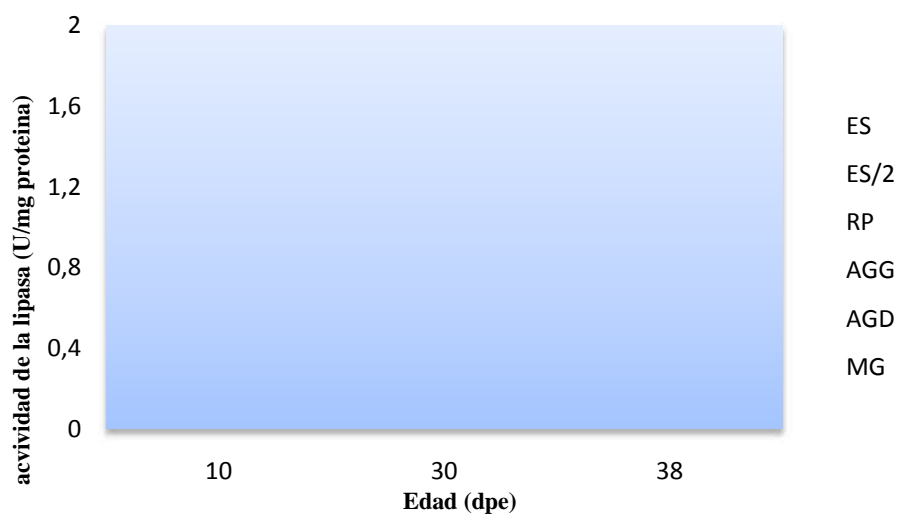
La actividad específica de de tripsina (U/mg Proteína) a nivel de los grupos ES, AGD, AGG, MG aumentó con la edad de los días 10, 30 y 38. Dicha actividad aumentó a los días 10 y 30 dpe en los grupos ES/2 y RP, mientras que disminuyó al día 38 dpe. Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en cada día de muestreo, se detectaron diferencias estadísticas en el día 38 (ANOVA,  $P < 0,05$ ) (Fig. 5.2.5.1.2.1.).



**Fig. 5.2.5.1.2.1.** Evolución de la actividad de la enzima Tripsina (mU/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 5.2.5.1.3 Lipasa

La actividad de la enzimática lipasa (U/mg Proteína) a nivel de los todos grupos se mantiene constantes con la edad. Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en cada día de muestreo, no se detectaron diferencias estadísticas sobre los niveles de actividad de esta enzima (ANOVA,  $P>0,05$ ) (Fig. 5.2.5.1.3.1.)

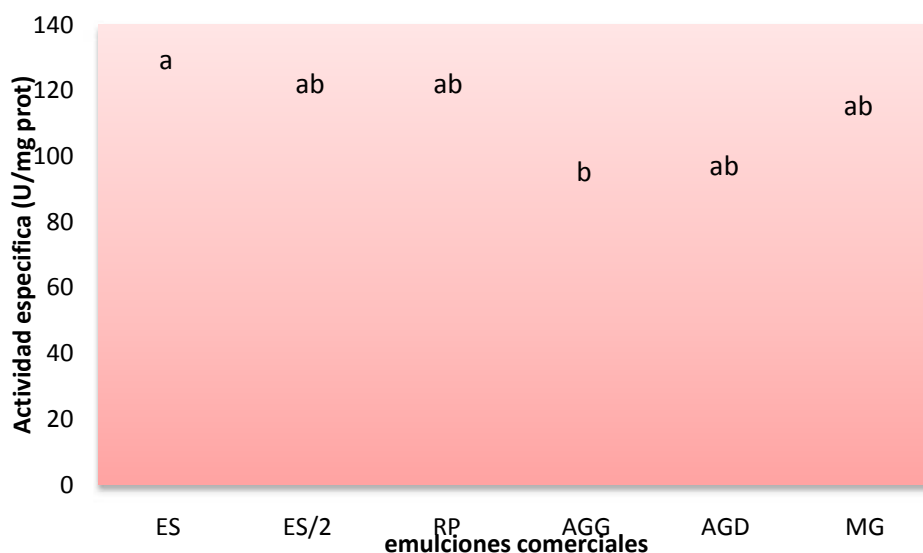


**Fig. 5.2.5.1.3.1.** Evolución de la actividad de la enzimática lipasa (U/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P>0,05$ ).

### 5.2.5.2. Enzimas intestinales citosólicas

#### 5.2.5.2.1. Leucina alanina peptidasa

No se dispone muestra para esta enzima durante del cultivo pudiéndose solo analizar al final del experimento. Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en al día de 38 de muestreo, se detectaron diferencias estadísticas en el día 38 (ANOVA,  $P < 0,05$ ) (Fig. 5.2.5.2.1.).

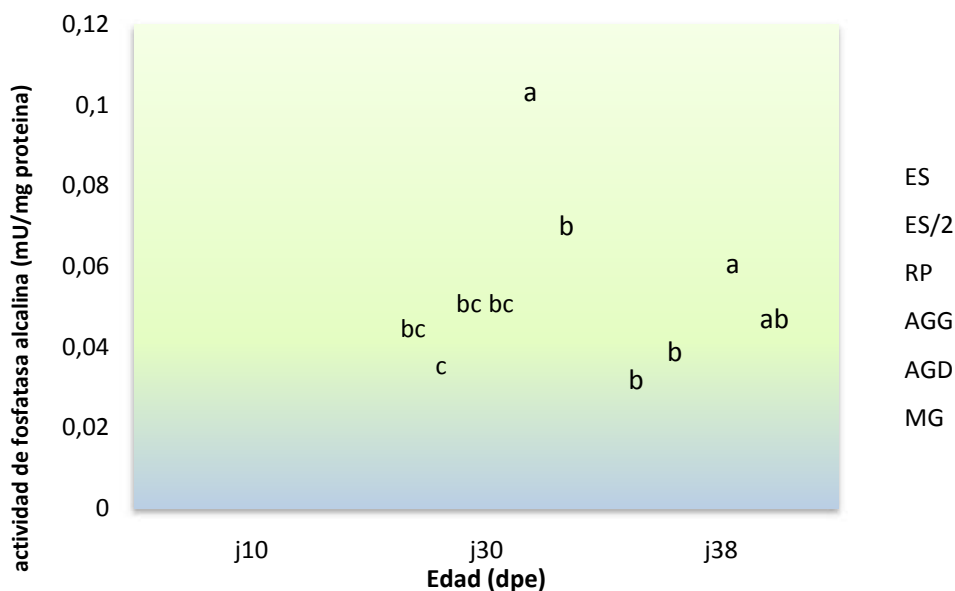


**Fig. 5.2.5.2.1.** Evolución de la actividad de la enzimática leucina alanina peptidasa (U/mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés 38 dpe. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 5.2.5.3. Enzimas intestinales del borde cepillo

#### 5.2.5.3.1 Fosfatasa alcalina

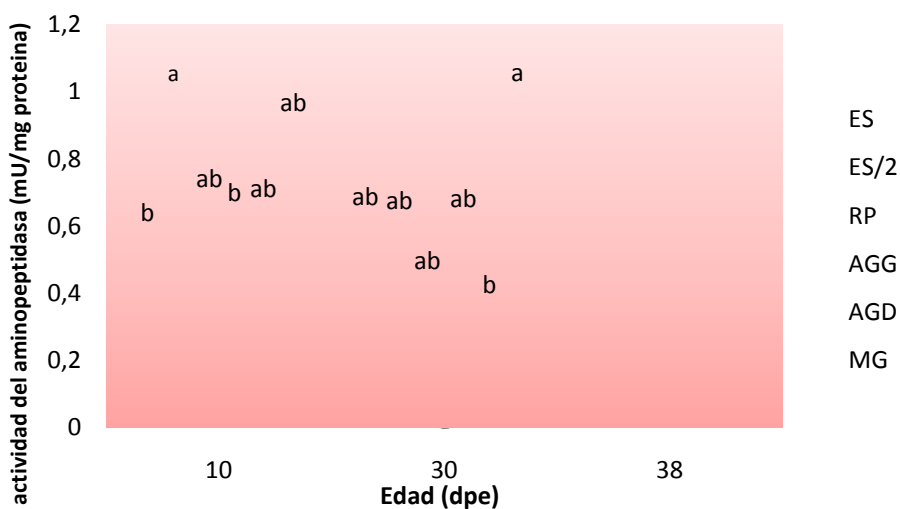
La actividad de la enzimática fosfatasa alcalina (mU/mg Proteína) a nivel del grupo AGG aumentó con la edad a los días 10, 30 y 38. Sin embargo, la actividad aumentó a los días 10 y 30 en los grupos ES, RP, AGD, ES/2 y MG, y disminuyó al día 38. Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en cada día de muestreo, se detectaron diferencias estadísticas en el día 30 y 38 (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



**Fig.5.2.5.3.1.1** Evolución de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (mU/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 5.2.5.3.2. Aminopeptidasa

La actividad del enzimática aminopeptidasa (mU/mg Proteína) a nivel del grupo ES aumentó con la edad a los días 10, 30 y 38. Sin embargo, la actividad disminuyó a los días 10 y 30 en los grupos AGG, AGD, y RP, y aumentó al día 38. Dicha actividad disminuyó a los días 10 ,30 y 38 en los grupos ES/2 y MG. Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en cada día de muestreo, se detectaron diferencias estadísticas entre de los días 10, y 30. (ANOVA,  $P < 0,05$ .)

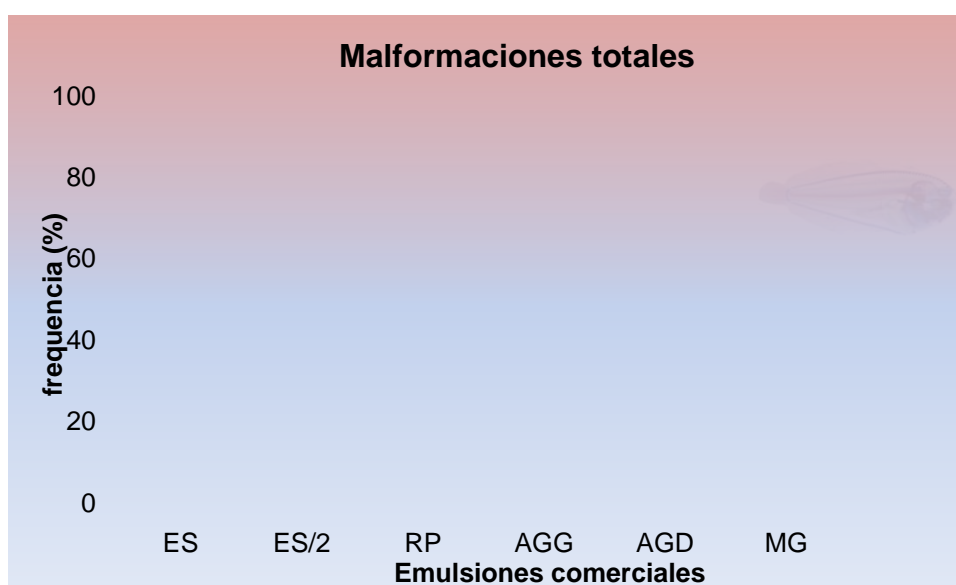


**Fig.5.2.5.3.2.1** Evolución de la actividad de la enzima aminopeptidasa (mU/ mg Proteína) en las larvas del lenguado senegalés alimentadas con las distintas emulsiones comerciales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

## 5.2.6. Deformaciones esqueléticas

### 5.2.6.1. Malformaciones totales (38 dph)

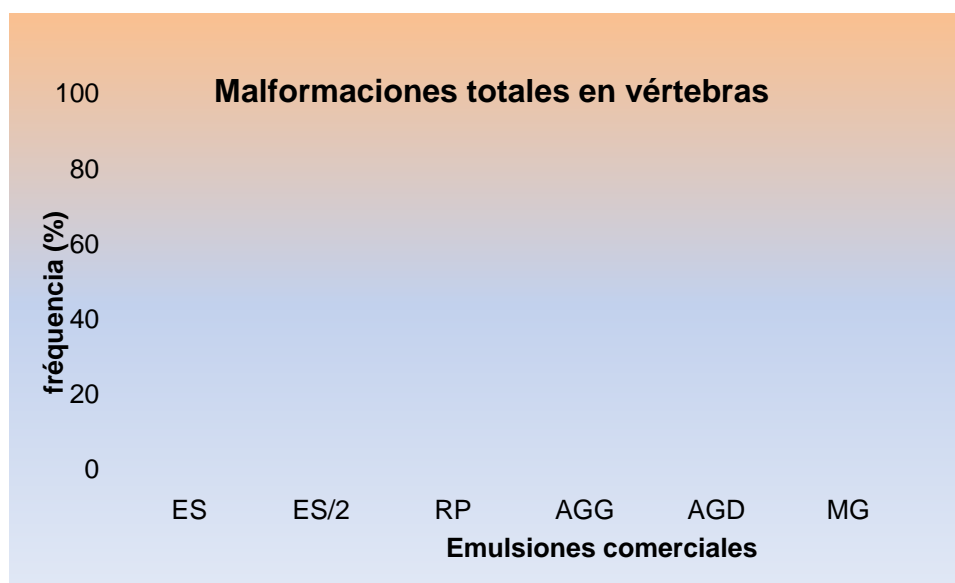
Para la observación de las malformaciones se tiñeron un total de 40-50 larvas por replicado (total 120-150 por tratamiento) 38 dpe, de cada emulsión, mediante el método de la doble tinción previamente descrito. No se detectaron diferencias estadísticas sobre malformaciones totales. Según la dieta considerada los niveles observado de malformaciones totales en función de las emulsiones fueron: ES (77,7%), ES/2 (75,9%), RP (78,8%), AGG (81,8%), AGD (81,9%), MG (82,6%) (**Fig.5.2.6.1.1**).



**Fig.5.2.6.1.1** Efecto de las distintas emulsiones sobre la incidencia de las deformaciones esqueléticas en larvas de lenguado alimentadas con las distintas emulsiones comerciales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD calculado a partir de tres replicas por tratamiento. (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

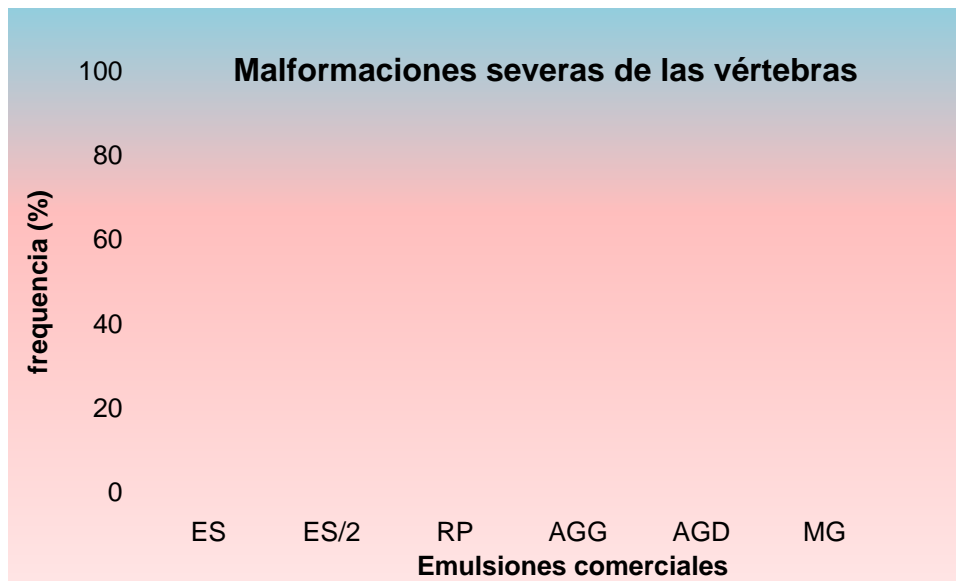
### 5.2.6.2 Columna vertebral

Analizando por separado a 38 dph el efecto de las distintas emulsiones, sobre la incidencia de malformaciones totales, malformaciones severas y malformaciones ligeras en cuerpos vertebrales que no existían diferencias significativas entre tratamientos. (ANOVA,  $P>0,05$ ). Los niveles observados de malformaciones totales de las vertebras en función de las emulsiones fueron: ES (68,0%), ES/2 (58,7%), RP (64,4%), AGG (68,9%), AGD (66,3%), MG (67,2%). Sin embargo los niveles observadas de malformaciones severas de las vertebras en función de las emulsiones fueron: ES (46,6%), ES/2 (39,9%), RP (37,7%), AGG (38,7%), AGD (50,8%), MG (36,6%) y en malformaciones ligeras de las vertebras fueron ES (56,4%), ES/2 (57,6%), RP (62,5%), AGG (60,4%), AGD (47,0%), MG (62,8%) **Fig .5.2.6.2.1.**

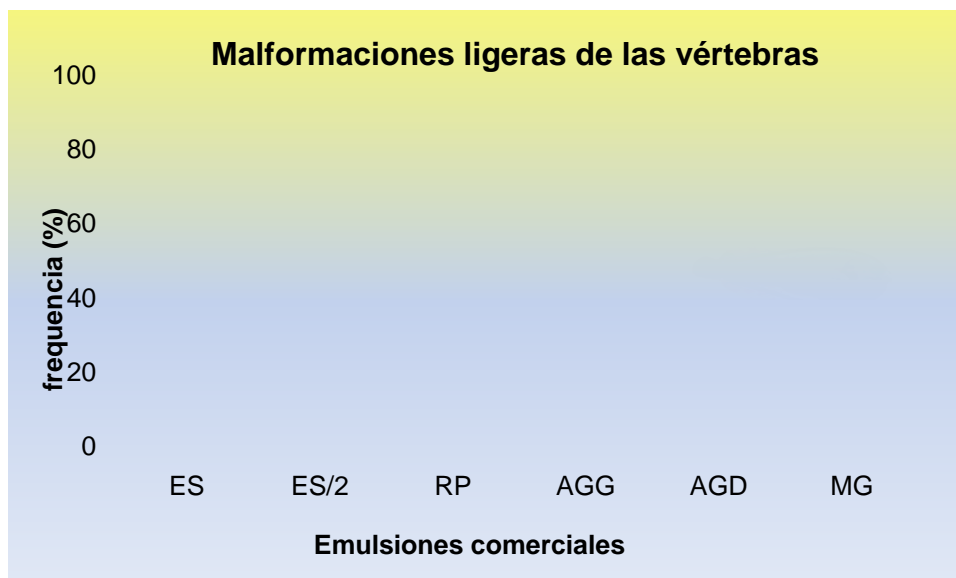


**Fig .5.2.6.2.1.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas totales en cuerpos vertebrales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P>0,05$ ).



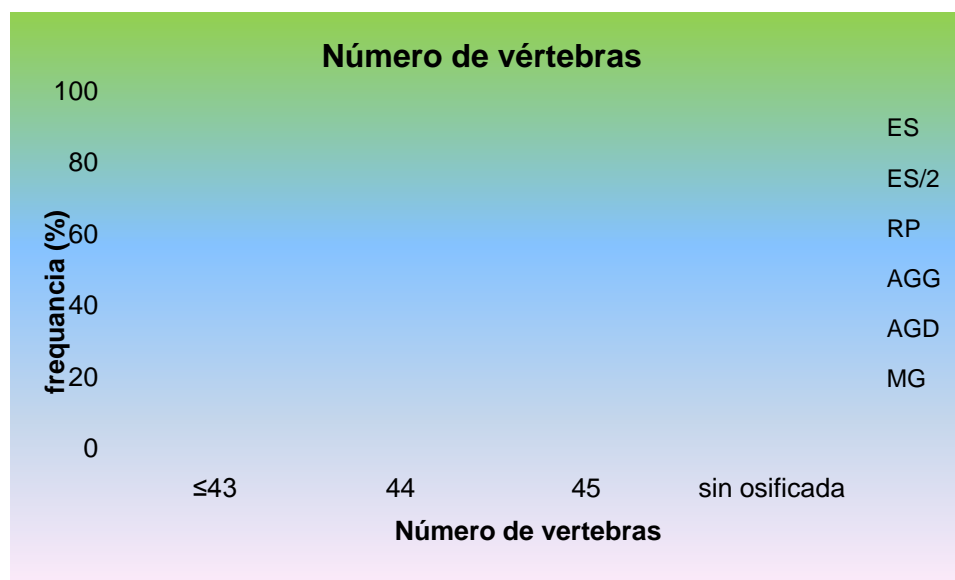


**Fig. 5.2.6.2.2.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas severas en cuerpos vertebrales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



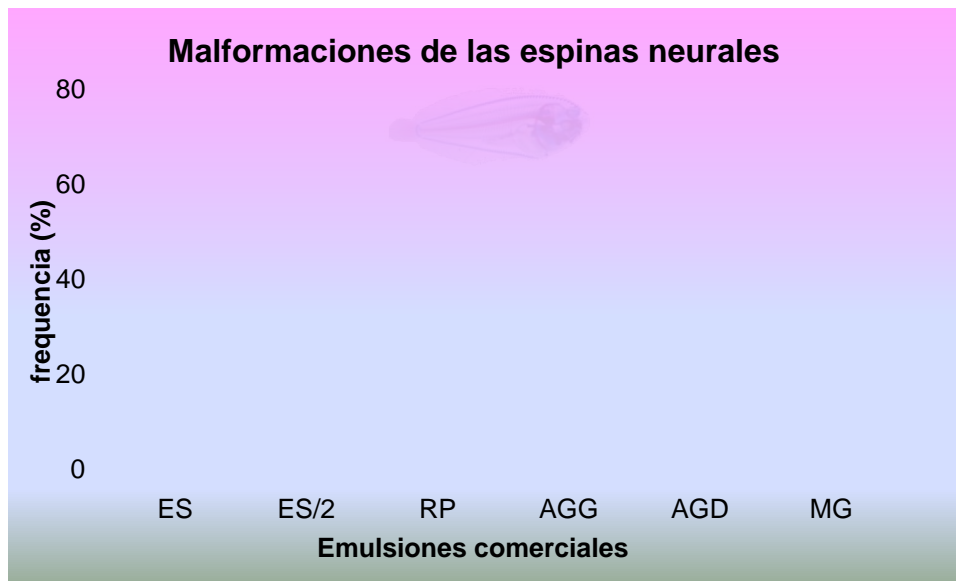
**Fig. 5.2.6.2.3.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas ligeras en cuerpos vertebrales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

El número normal de vértebras para el lenguado de 45. En el presente estudio no se detectaron diferencias significativas en el efecto de las distintas emulsiones en relación al número de vértebras (45) de los individuos (**Fig. 5.2.6.2.4.**)

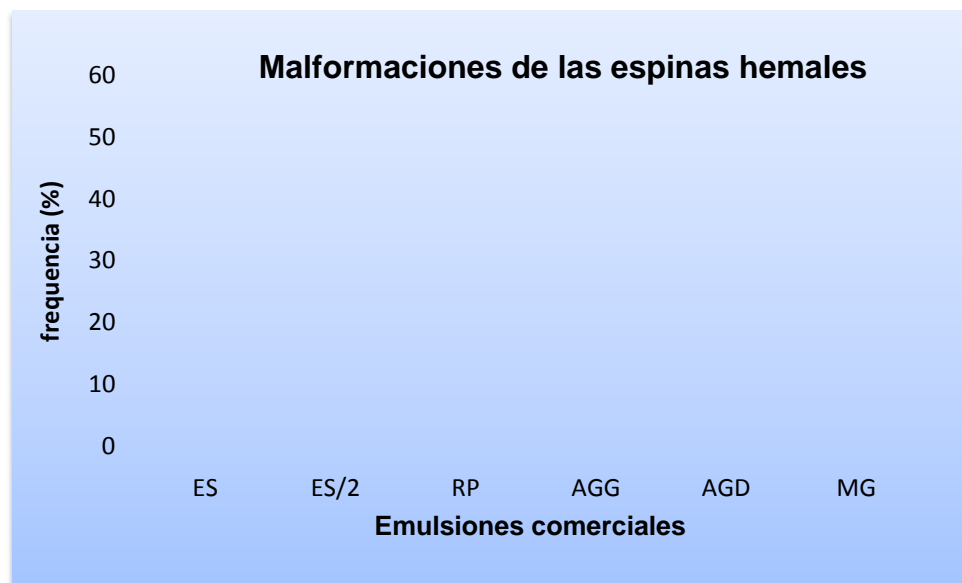


**Fig. 5.2.6.2.4.** Efecto de las distintas emulsiones sobre el número de vértebras del esqueleto de las larvas del lenguado. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones en el día 38 dpe de muestreo, no se detectaron diferencias estadísticas sobre de ni malformaciones de las espinas neurales ni malformaciones de las espinas hemales. Los niveles observados de malformaciones de las espinas hemales en función de las emulsiones fueron: ES (40,3%), ES/2 (33,2%), RP (35,4%), AGG (31,8%), AGD (30,0%), MG (36,1%) y malformaciones de las espinas neurales fueron: ES (50,5%), ES/2 (56,8%), RP (58,9%), AGG (58,7%), AGD (42,2%), MG (57,5%) **Fig. 5.2.6.2.5. Y Fig. 5.2.6.2.6.**



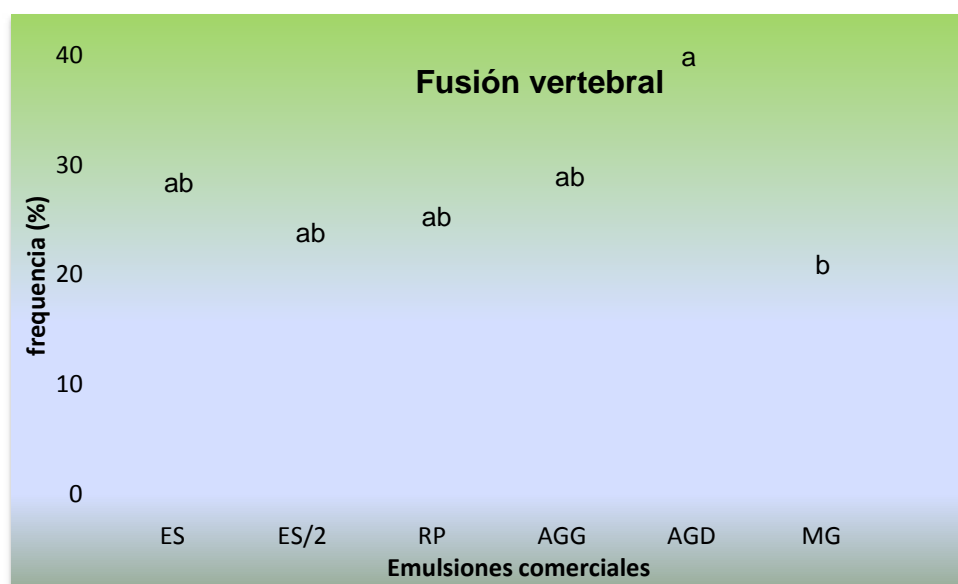
**Fig. 5.2.6.2.5.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con espinas neurales (NS) deformes. . Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



**Fig. 5.2.6.2.6.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con espinas hemales (HS) deformes. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

## Resultados

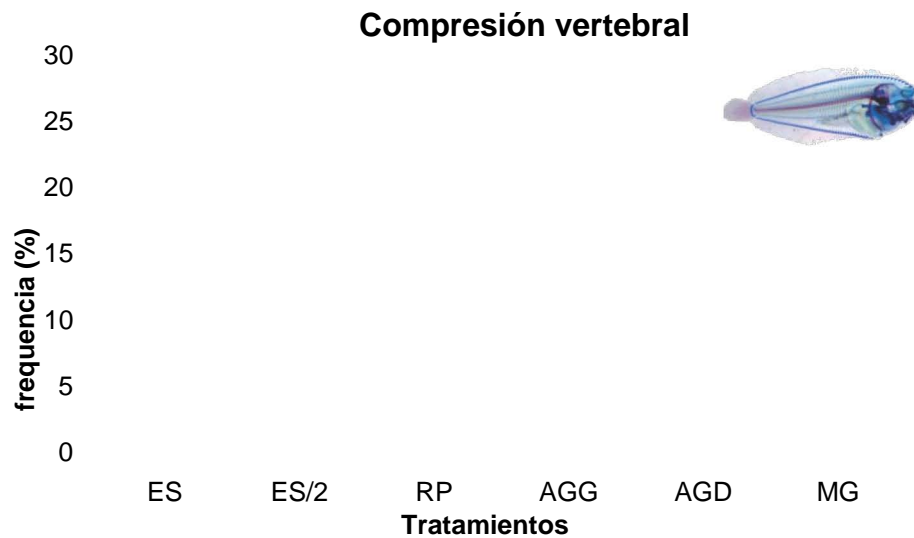
Se detectaron diferencias significativas en el efecto de las distintas emulsiones en relación a la incidencia de vertebrales fusionadas en animales alimentadas con distintas emulsiones comerciales. Las larvas que se alimentaron con la *Artemia* enriquecida con AGD, muestran una mayor frecuencia de fusiones vertebrales que otras larvas alimentadas con otras emulsiones. Los niveles de fusión en función de las emulsiones fue: ES (18,7%), ES/2 (19,9%), RP (17,2%), AGG (22,4%), AGD (30,6%), MG (15,6%).



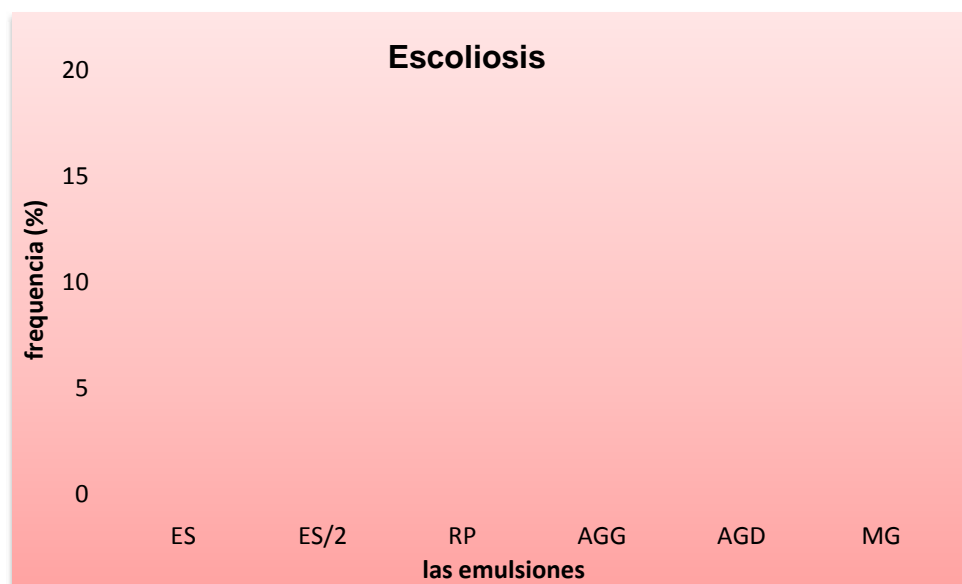
**Fig. 5.2.6.2.7.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con fusiones vertebrales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Las letras indican diferentes significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Analizando el efecto de las distintas emulsiones a 38 dpe, no se detectaron diferencias estadísticas en relación al porcentaje de casos de compresión vertebral y escoliosis (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Sin embargo, los niveles compresión en función de las emulsiones fueron: ES (13,0%), ES/2 (10,3%), RP (13,3%), AGG (18,9%), AGD

(16,7%), MG (15,0%), los niveles de escoliosis fueron ES (7,5%), ES/2 (2,7%), RP (4,3%), AGG (6,8%), AGD (6,5%), MG (2,5%) **Fig. 5.2.6.2.7. y Fig. 5.2.6.2.8.**



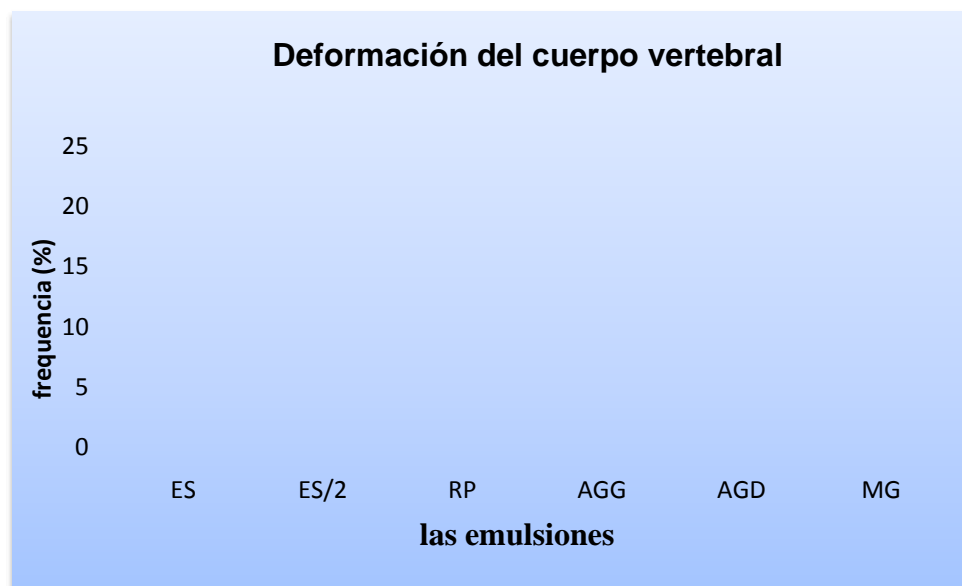
**Fig. 5.2.6.2.8.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con compresión vertebral. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



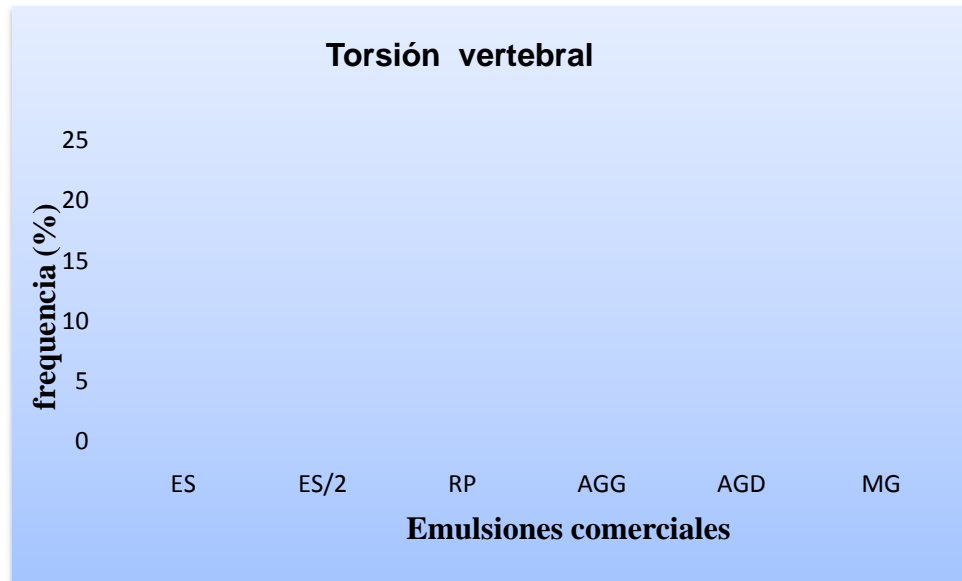
**Fig. 5.2.6.2.9.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con escoliosis. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

## Resultados

No se detectaron diferencias significativas en el efecto de las distintas emulsiones con relación a deformación del cuerpo vertebral( hipófisis, parahipofisis alteradas) torsión del cuerpo vertebrales, los niveles de deformación del cuerpo en función de las emulsiones fueron : ES (16,4%), ES/2 (9,3%), RP (14,8%), AGG (6,9%), AGD (15,2%), MG (7,9%), los niveles de torsión fueron : ES (8,5%), ES/2 (6,8%), RP (10,7%), AGG (3,4%), AGD (10,9%), MG (6,8%) **Fig. 5.2.6.2.9. y Fig. 5.2.6.2.1.0.**



**Fig. 5.2.6.2.1.0.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con anomalías vertebrales. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).



**Fig. 5.2.6.2.1.1.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con torsión vertebral. Los datos muestran las medias  $\pm$  SD (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

### 5.2.6.3. Complejo caudal

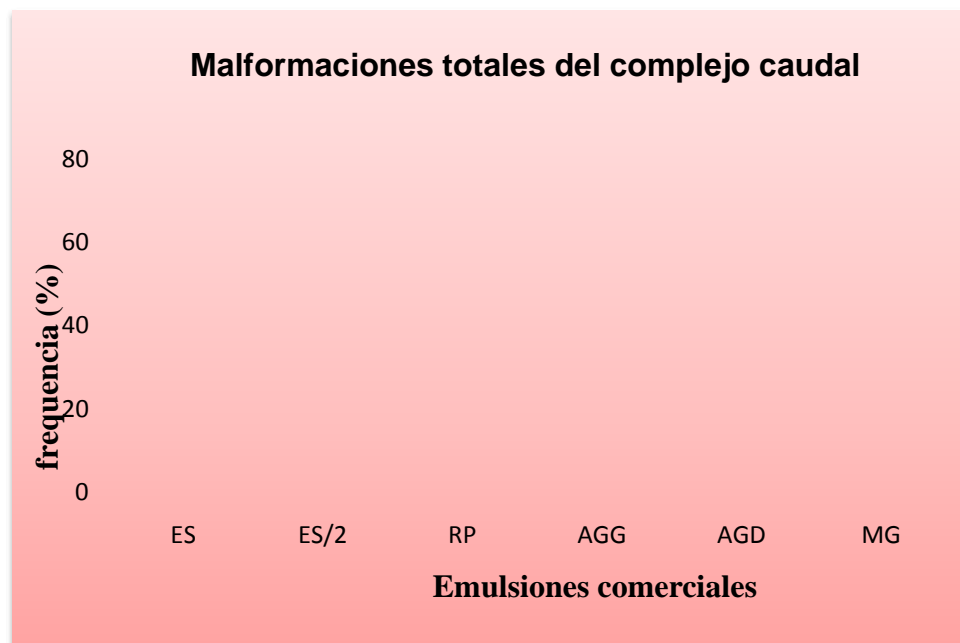
Analizando por separado el efecto de las distintas emulsiones a 38 dpe de muestreo, no se detectaron diferencias estadísticas sobre el porcentaje de malformaciones totales en el complejo caudal sus estructuras (hipurales, parahypural y epural). (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

Sin embargo si se detectaron diferencias estadísticas sobre de malformaciones de las espinas hemales y neurales modificadas. (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Los niveles observados de malformaciones totales de complejo caudal en función de las emulsiones fueron: ES (52,6%), ES/2 (60,3%), RP (64,9%), AGG (67,2%), AGD (66,6%), MG (56,9%), los niveles de malformaciones de las hipurales, parahipural y epural fueron : ES (26,9%), ES/2 (23,8%), RP (36,6%), AGG (42,3%), AGD (40,5%), MG (35,65%) **Fig.5.2.6.3.1.** y **Fig.5.2.6.3.2.**

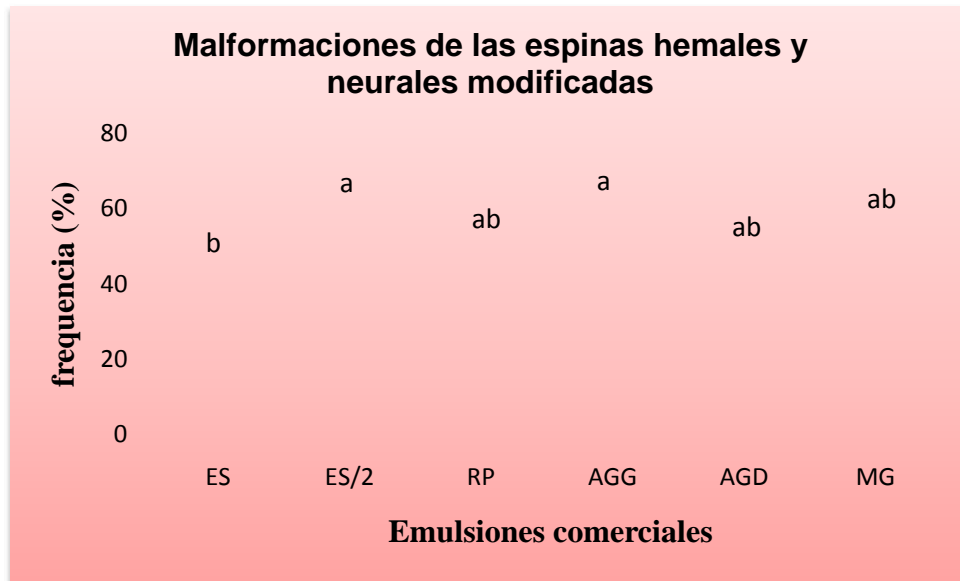
## Resultados

Las larvas que se alimentaron con la *Artemia* enriquecida con AGG y ES/2 mostraron una mayor frecuencia de malformaciones en las espinas hemales y neurales modificadas que las larvas alimentadas con otras emulsiones. Los niveles de las malformaciones de las espinas hemales y neurales modificadas en función de las emulsiones fueron: ES (39,7%), ES/2 (54,1%), RP (47,3%), AGG (55,9%), AGD (44,7), MG (49,3%) **Fig.5.2.6.3.2.**

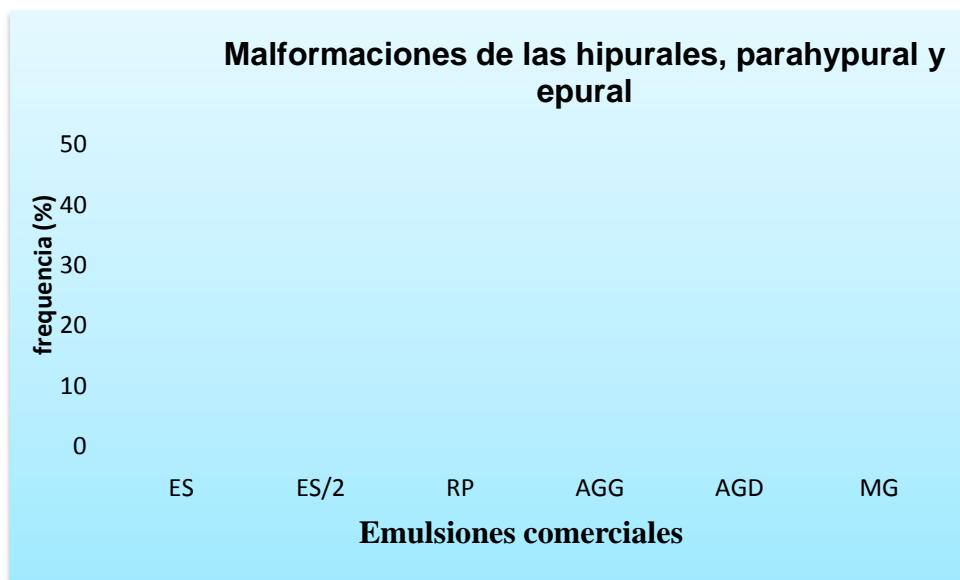


**Fig.5.2.6.3.1** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con deformaciones en el complejo caudal (ANOVA,  $P > 0,05$ ).





**Fig.5.2.6.3.2.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con malformaciones en las espinas hemales y neurales modificadas. Las letras indican diferentes significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



**Fig.5.2.6.3.3.** Efecto de las distintas emulsiones en la frecuencia de individuos con malformaciones de los hipurales, parahipural y epural que forman el complejo caudal (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

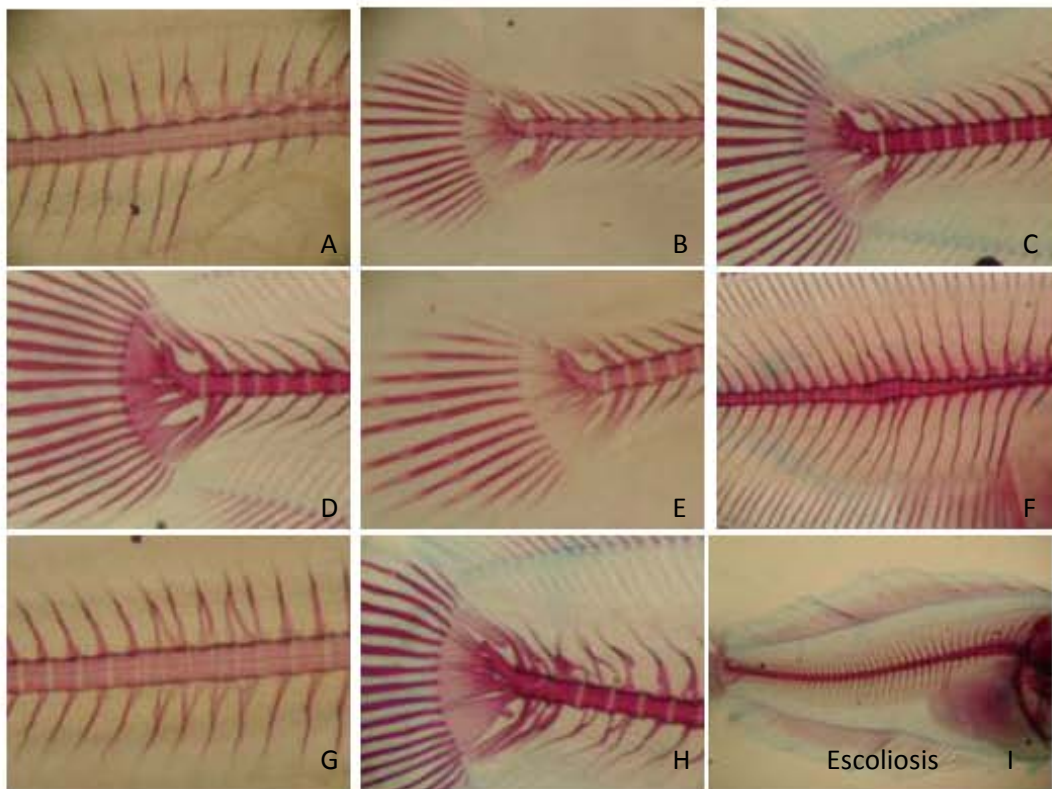
## Resultados

En la tabla 5.2.6. Se encuentran resumidos los resultados globales sobre el efecto de las distintas dietas sobre la calidad de las larvas de lenguado (incidencia de deformaciones esqueléticas).

**Tabla 5.2.6.** Efecto de las distintas emulsiones sobre de crecimiento y desarrollo esquelético larvas de lenguado en la frecuencia de individuos con la deformación esquelética.

Las letras indican diferentes significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

	Dietas experimentales					
	ES	ES/2	RP	AGG	AGD	MG
<b>Deformaciones totales</b>	<b>77,8±10,2</b>	<b>75,9±11,8</b>	<b>78,0±2,8</b>	<b>81,9±0,7</b>	<b>82,0±3,8</b>	<b>82,7±2,0</b>
Anomalías vertebrales	68,0±13,6	60,4±11,4	65,2±5,1	69,7±4,6	66,3±9,4	67,3±7,1
Defromaciones severas	46,7±15,0	40,0±5,7	37,7±7,0	39,6±1,6	50,8±10,2	36,7±4,3
Fusión	18,7±6,9 <sup>ab</sup>	20,0±0,6 <sup>ab</sup>	17,2±5,7 <sup>ab</sup>	22,5±4,4 <sup>ab</sup>	30,6±7,1 <sup>a</sup>	15,7±2,4 <sup>b</sup>
Compresión	13,1±12,6	10,4±6,4	13,4±3,6	18,9±3,6	16,8±7,1	15,0±4,9
Cuerpos vertebrales	16,4±4,0	9,4±4,0	14,8±3,2	7,0±4,2	15,2±6,7	8,0±3,1
Torsión	8,5±7,2	6,8±5,4	10,7±7,6	3,4±3,8	10,9±10,5	6,9±3,9
Escoliosis	7,5±7,9	2,8±0,4	4,4±1,4	6,8±3,8	6,5±1,4	2,5±2,4
Deformaciones leves	56,5±9,3	57,6±8,9	62,6±4,9	61,3±6,9	47,1±2,6	62,8±5,8
Espinas hemales	40,3±11,3	33,2±7,2	35,5±8,2	31,8±2,8	30,0±7,2	36,1±12,2
Espinas neurales	50,6±11,2	56,8±10,3	59,0±4,6	58,7±6,9	42,3±2,0	57,6±8,4
<b>Anomalias caudales</b>	<b>52,6±11,4</b>	<b>60,4±4,9</b>	<b>65,0±9,7</b>	<b>67,3±4,7</b>	<b>66,7±6,0</b>	<b>57,8±11,7</b>
Mns-Mhs	39,7±3,3 <sup>b</sup>	54,2±6,5 <sup>a</sup>	47,4±2,8 <sup>ab</sup>	55,9±4,4 <sup>a</sup>	44,7±4,4 <sup>ab</sup>	49,3±6,7 <sup>ab</sup>
HYP-PHY-EP	27,0±11,9	23,8±5,6	36,6±10,3	42,4±4,4	40,6±4,4	35,7±6,7



**Fig.5.2.6.3.4.** Ejemplo de malformaciones encontradas en larvas de *Solea senegalensis* a 38dph a-) Fusión de las espinas neurales de las vertebrae caudales ( $\rightarrow$ ); b-) Fusión de los cuerpos vertebrales de las ultimas vertebrae caudales ( $\rightarrow$ ); c) Defecto de fusión de los arcos de la espina hemal modificada y la espina neurale de una de las ultimas vertebrae caudales ( $\rightarrow$ ) y fusión de los hipurales 1 y 2 ( $\star$ ); d-) Fusión de los hipurales 1-2 ( $\star$ ) e-) Fusión del parahypural y de los hipurales 3 ,4, 5 ( $\star$ ); f-) Compresión de vertebrae caudales ( $\square$ ); g-) Torsión de las vertebrae caudales ( $\circ$ ); h-) Compresión general de la región caudal: fusión de los cuerpos vertebrales de las ultimas vertebrae ( $\rightarrow$ ) y deformación de sus espinas hemales y neurales ( $\perp$ ) fusión del hipural 1 con el parahypural ( $\star$ ), fusión de los hipurales 1, 2 , deformación de los hipurales 4 y 5 y del urostyle ( $\blacktriangle$ ); i-) Escoliosis.

## 6. DISCUSIÓN

▲ ▲

El objetivo inicial del presente trabajo era comparar el efecto de distintos niveles de ácidos grasos esenciales poliinsaturados como el ácido docosahexanoico (DHA) y eicosapentanoico (EPA) en la dieta (*Artemia* enriquecida) sobre el crecimiento, supervivencia y calidad de larvas de lenguado mediante el uso de emulsiones experimentales formuladas según Villalta (2005a). Sin embargo, debido a problemas de disponibilidad de varios aceites ricos en los citados ácidos grasos esenciales y que se pretendían utilizar para formular dichas emulsiones, se optó por otra estrategia, decidiéndose utilizar para dicho fin distintas emulsiones y enriquecedores comerciales disponibles en el mercado y que presentaban unos niveles de DHA, EPA y DHA/EPA distintos. Por lo tanto, los resultados que se presenta y se discuten a continuación no sólo se han de considerar como los efectos directos de la variación de los nutrientes objeto de estudio como el DHA y EPA, sino también que han de ser considerados según la composición global de la emulsión y/o enriquecedor considerado.

Teniendo en cuenta lo anteriormente citado, los resultados para cada uno de los grupos experimentales considerados se han valorado en función de los siguientes parámetros: crecimiento en longitud y peso, supervivencia, maduración del sistema digestivo e incidencia de deformaciones esqueléticas.

### **6.1. Composición en ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida**

Las presas vivas utilizadas comúnmente como alimento para las larvas de peces marinos (los rotíferos y *Artemia*) de forma natural son deficientes en HUFAs de la serie n-3, en especial en DHA (Rainuzzo *et al.* 1994; Sargent, 1997). Debido a esta deficiencia, y al requerimiento esencial de los HUFA n-3 en larvas de peces marinos, es indispensable enriquecer el alimento vivo con productos ricos en HUFAs n-3 antes de

suministrarlo a las larvas. Varias técnicas de enriquecimiento han sido desarrolladas para incrementar el nivel de n-3 HUFA en presas vivas (Takeuchi *et al.*, 1992). Usando estas técnicas, varios estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto de la ingestión de presas enriquecidas por diferentes larvas de peces marinos (Furita *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996). Para lograr esto, se utilizan ciertas combinaciones de algas, protistas, levaduras, aceites y emulsiones ricas en HUFAs n-3. En este sentido en nuestro trabajo hemos evaluado distintas emulsiones comerciales que presentaban distintos niveles de HUFA y n-3/n-6.

Los seis enriquecedores/emulsiones comerciales usadas en este estudio se diferencian por su composición en ácidos grasos tanto por los valores absolutos como los relativos, en particular las composiciones absolutas y relativas de los ácidos grasos esenciales EPA, DHA y ARA. Nos interesaremos a continuación para interpretar el efecto de estas emulsiones sobre el crecimiento y el desarrollo de las larvas, si bien a priori es importante poder caracterizar el perfil de HUFAs de la *Artemia* según el enriquecimiento considerado. La *Artemia* enriquecida con AGG, mostró niveles intermedios de DHA, ARA y mostró nivel de baja EPA comparada con la *Artemia* enriquecida con otros enriquecedores, si bien dichos niveles son significativamente distintos al resto de grupos. La *Artemia* enriquecida con MG mostró niveles altos desde el punto de vista estadístico de DHA, ARA y DHA/EPA y mostró nivel de intermedio EPA. La *Artemia* enriquecida con ES mostró niveles bajos de DHA y DHA/EPA, niveles intermedios de ARA y niveles altos de EPA relativamente. La *Artemia* enriquecida con ES/2 mostró niveles bajos de ARA, DHA y DHA/EPA. La *Artemia* enriquecida con RP mostró niveles intermedios de EPA, DHA, y DHA/ EPA relativamente, alta nivel de ARA. La *Artemia* enriquecida con AGD mostró niveles bajos de ARA intermedio nivel de EPA, altos de DHA y DHA/EPA. Los resultados

anteriormente citados muestran como el perfil de HUFAs, y en particular de EPA, DHA y DHA/EPA, de la *Artemia* varió de forma significativa en función del enriquecedor/emulsión comercial considerada.

### 6.2. Crecimiento y supervivencia

Es bien conocido que los HUFAs, principalmente el EPA, DHA y el ácido araquidónico (ARA) son esenciales para el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de los peces marinos (Sargent et al., 1999). Además de sus efectos estimulantes sobre crecimiento, el EPA y DHA están también implicados en el desarrollo del sistema nervioso, cerebro y células visuales (Furuita et al., 1998), y en el desarrollo de la pigmentación en peces planos (Reitan et al., 1994; Shields et al., 1999). A pesar de la gran cantidad de investigaciones que se llevan a cabo para determinar los requerimientos larvarios en HUFA n-3, en esta última década se han tenido en cuenta los HUFA n-6, la relación entre ambas series, y en particular el ARA. Distintos trabajos han mostrado que durante las épocas de ayuno, el ARA se conserva en los tejidos de los peces marinos (Izquierdo, 1996), incluido el lenguado senegalés (Mourente y Vazquez, 1996), y sirve como precursor para la biosíntesis de eicosanoides (Bell et al., 1994). Sin embargo, los altos niveles de ARA están implicados en anomalías pigmentarias (McEvoy et al., 1998; Estevez et al., 1999; Copeman et al., 2002; Bell et al., 2003).

En nuestro trabajo, el contenido HUFA de las emulsiones experimentales se vio reflejado en la *Artemia*. Los resultados observados muestran como las larvas que se alimentaron con la *Artemia* enriquecida con AGG, muestran mejor crecimiento en peso seco y longitud estándar que otras larvas alimentadas con el resto de emulsiones/enriquecedores evaluados. Las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida

con AGD, MG y RP, presentaron valores intermedios de crecimiento en comparación con aquellas alimentadas con ES y ES/2 que presentaron un menor crecimiento. De forma resumida cabe señalar que la *Artemia* enriquecida con AGG contenía la concentración más elevada de ácido linolenico, ARA (0,7 % TFA), DHA/EPA (3,0), OA (26,2 % TFA) y total HUFAn-3 (42,5 % TFA) y niveles intermedios de DHA (9,5% TFA). En nuestro caso, la *Artemia* enriquecida con AGD, RP, Y MG, mostró un alto nivel de DHA (11,5, 11,8 y 16,9 % TFA, respectivamieto) no viéndose esta mayor incorporació de DHA correlacionada con un mejor crecimiento y y supervivencia en larvas de lenguado. Finalmente mencionar que las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con ES y ES/2 mostraron un menor crecimiento, presentado la *Artemia* unos niveles relativamente bajos de DHA (5,5 y 1,3% TFA, respectivamente). En otros trabajos se ha visto que las larvas del lenguado senegalés son capaces de sobrevivir y crecer hasta el día 36 después de la eclosión cuando se alimentan de nauplios de *Artemia* que no contienen DHA, pero sí otros HUFA n-3. Estos resultados sugieres que el lenguado senegalés tiene unos bajos u nulos requerimientos por este ácido graso tal y como postuló Morais et al. (2004), si bien dichos valores sí que tienen un efectodirecto sobre el crecimiento tal y como muestran las larvas del presente estudio alimentadas con *Artemia* enriquecida con ES/2 (DHA = 1,5% TFA).

En un trabajo reciente publicado por Vizcaíno et al. (2010), se ha visto que las larvas de platija californiana (*Paralichthys californicus*) alimentadas con dietas que tenían distintos niveles de DHA, recomendaron que los requerimientos nutricionales en DHA para las larvas premetamórficas y postmetamórficas de esta especie estaban entorno al 1,2 y 2,4% respectivamente, valores que son mucho más bajos que los observados en lenguado. En el tesis doctoral de Villallta (2007), las larvas de lenguado fueron alimentados con *Artemia* enriquecida que contenía distintos niveles de DHA,



observándose que la dieta que tenía unos niveles medios DHA (7,7 % TFA) presentaba un mejor crecimiento. En nuestro caso, los mejores resultados de crecimiento fueron observados en aquellas larvas alimentadas con unos niveles de DHA del 9,5% TFA. Por el contrario, según tesis doctoral de Villalta (2007), las larvas alimentadas con dietas que tenían altos niveles de DHA (14,7 %) mostraron un menor crecimiento que el grupo control, por lo que se puede deducir que los requerimientos nutricionales en DHA para las larvas de lenguado considerándose sólo el parámetro del crecimiento deben estar comprendidos entre los 7,7 y 9,5% TFA, según los resultados de tesis doctoral de Villalta (2007), y el presente estudio. Para otras especies los valores de DHA recomendados son para *Pagrus major* (1,2 %), *Dentex dentex* (2,3 %), *Sparus aurata* (0,8 %), *Latris lineata* (2,0%) (Izquierdo et al., 1989; Mourente et al., 1999; Izquierdo, 2005; Bransden et al., 2005).

Generalmente, el crecimiento y la supervivencia de organismos marinos, observado en diferentes estudios, ha sido bueno cuando se utiliza *Artemia* como alimento con niveles superiores al 4% de EPA, mientras que valores inferiores al 3% son desaconsejables en términos de peso y supervivencia larvaria (Leger et al., 1986; Izquierdo et al., 2000). A nivel general se recomienda que los niveles óptimos en EPA y DHA en la dieta estén comprendidos entre 6,8% 3,6%, respectivamente (Watanabe y Kiron, 1994). En el caso de la lubina estriada *Morone saxatilis* se ha visto que los niveles óptimos de EPA en términos de crecimiento y supervivencia oscilan entre el 9,3 y 10,4 % (Civera 1985 citado por Izquierdo et al., 1989). , Por el contrario, Tamaru et al. (1991) sugirieron un contenido mínimo del 0,7% en EPA y 0,5% en DHA en los rotíferos para las larvas de lisa (*Mugil cephalus*). En nuestro trabajo, los niveles de EPA en la *Artemia* enriquecida variaron entre el 3.1 y el 7.6% (TFA), encontrándose un mejor crecimiento en aquellas alimentadas con 3, 1% de EPA (AGG). . En el tesis

doctoral de Villallta (2007) , las larvas de lenguado alimentadas con la dieta que tenía un contenido de EPA de 4,8% TFA, tenía un mejor crecimiento, pero baja supervivencia, si bien las larvas del lenguado son capaces de crecer y sobrevivir hasta el día 40 edad con contenidos nulos de EPA en la dieta. En nuestro trabajo, la *Artemia* enriquecidas con las emulsiones de ES, RP y MG presentaron un alto nivel de EPA (7,6; 5,1 y 4,9% TFA, respectivamente), y esto se vio asociado a menores crecimientos en peso y longitud. Por el contrario, valores de EPA entre 3,1% y 3,7% (enriquecedores ES/2, AGG y AGD) presentaron un mayor crecimiento para las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con AGG y AGD en comparación con el resto de tratamientos, si bien valores de EPA del 3,1% en la *Artemia* enriquecida con E/2 no se correspondieron con buenas tasas de crecimiento. Resultados que vienen dado por el bajo contenido de DHA en la *Artemia* enriquecida con ES/2, así como también unos valores bajos de DHA/EPA, mostrando a nivel general un perfil nutricional bajo de la presa viva enriquecida con esta emulsión.

No existe mucha información sobre los niveles óptimos del ratio DHA/EPA para larvas de especies marinas. La composición lipídica de los huevos/reservas vitelinas ha sido sugerida como indicador para determinar los requerimientos nutricionales en el caso de las larvas recién eclosionadas. Así, el ratio DHA/EPA de 2:1 en las dietas para especies marinas es el más adecuado, por tanto dicho ratio ha sido tomado como referencia para la nutrición larvaria (Sargent et al., 1997). Estos mismos autores sugieren en su estudio que una dieta con nivel de DHA/EPA inferior o igual a 1 se considera una dieta sub-optimal, a causa de que ésta podría no ofrecer suficiente cantidad de DHA o al contrario provocar un exceso de EPA. Los niveles de DHA/EPA en dietas que promueven un máximo crecimiento y supervivencia en lubina se encuentran dentro del rango de los obtenidos para otras especies como la dorada y

corvinón ocellado (*Sciaenops ocellatus*), con valores de 2:1 y 2,5:1, respectivamente (Rodríguez et al., 1998; Brinkmeyer y Holt, 1998), indicando un similar requerimiento en ácidos grasos esenciales para estas especies. Sin embargo, en el reciente trabajo de Vizcaíno et al. (2010), se observó que la dieta que contenía un ratio DHA/ EPA de 0,64, mostró un mejor crecimiento, supervivencia y pigmentación en larvas de platija californiana. En nuestro trabajo, las larvas alimentadas con los enriquecedores de AGG y AGD mostraron un mejor crecimiento, mientras que la *Artemia* enriquecida con estos enriquecedores contenía un ratio DHA / EPA de 3,0 y 3,3, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo los trabajos previos de Sargent et al. (1997), Reitan et al. (1994) y tesis doctoral de Villallta (2007) quienes recomiendan que el ratio DHA/EPA sea superior a 2, si bien contrastan bastante con los recientemente publicados por Vizcaíno et al. (2010).

No sólo los niveles de HUFAs son importantes para el buen desarrollo de la larva, sino también lo es la forma en que son incluidos en la dieta. Varios autores han sugerido que los fosfolípidos son una mejor fuente de ácidos grasos esenciales para las larvas que los triglicéridos (Olsen *et al.* 1991; Koven *et al.* 1993; Sargent *et al.* 1993). La proporción de DHA/EPA en los fosfolípidos de copépodos es de 2:1, mientras que en el aceite de pescado, compuesto mayormente de triglicéridos, es menor o igual a 1:1. Como consecuencia, se ha sugerido que la proporción de DHA/EPA en el aceite de pescado puede resultar subóptima. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que los efectos positivos de los fosfolípidos no son solamente atribuibles a su composición y proporción en ácidos grasos esenciales o a sus propiedades emulsificadoras, sino más bien a su estructura básica glicero-fosfórica (*eg.* fosforoglicerocolina). Esta estructura sirve de esqueleto para la síntesis de fosfolípidos por parte de la larva, lo cual es sumamente importante dada la limitada capacidad que tienen las larvas para sintetizar

de *novo* la estructura glicerofosfórica (Guerden *et al.*, 1995 a,b ; Coutteau *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1999).

Investigaciones adicionales ha mostrado que no es suficiente adicionar sólo EPA y DHA a la dieta de peces marinos. El entendimiento en el rol de estos ácidos grasos en la dieta de peces marinos ha evolucionado a tratar de determinar los niveles óptimos de EPA y DHA en la dieta considerando el valor relativo de EPA y DHA, así como de AA en la dieta de animales marinos (Sargent *et al.*, 1997). En la revisión realizada por Sargent (1997) se concluye que se requiere de una dieta que incluya una relación EPA/DHA/AA para el sano mantenimiento de los peces marinos. En este sentido, estudios recientes han demostrado la importancia del ácido araquidónico (ARA) en algunas larvas de peces marinos. En juveniles de *Scophthalmus maximus*, el alto crecimiento obtenido se ha relacionado con los fosfolípidos (PL) de la yema a del huevo de gallina en especial con el contenido de ARA (Castell *et al.*, 1994). Sin embargo, la alta incorporación de ARA en la fracción de lípidos polares en larvas de *Sparus aurata* causada por el incremento de lecitina de soja en las dietas que contenían fosfolípidos marinos, no promovieron un mayor crecimiento de los peces (Salhi *et al.*, 1995). En larvas de esta especie, el ARA parece ser importante para su supervivencia y resistencia al estrés, pero no es eficiente para promover un incremento en el crecimiento como DHA o EPA. De esta manera los niveles óptimos de ARA deben estar entre 0,1 a 1,0% para las microdietas de las larvas de *Sparus aurata*. Los lípidos totales y polares en las larvas particularmente la PC, incrementados con el ARA dietarios, así como la incorporación en lípidos neutros (NL) y PL, parecen jugar un importante papel en la pigmentación de *Paralichthys olivaceous* (Estévez *et al.*, 1997). En nuestro trabajo las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con AGG presentó un mejor crecimiento, presentado unos valores de ARA entorno al En los trabajos previos de tesis doctoral de

Villallta (2007) la dieta que tenía bajo nivel de ARA (0,1%), mostró un menor crecimiento en comparación con niveles superiores de este ácido graso esencial en la dieta. En nuestro trabajo, la *Artemia* enriquecida con la emulsión de MG, ES, ES/2 y RP presentaron un contenido de ARA del 1,1, 0,5, 0,3 y 0,4 % TFA (valores superiores a los de tesis doctoral de Villallta (2007) ), estando asociados dichos niveles de ARA en la dieta con un menor crecimiento de las larvas. La *Artemia* enriquecida con AGG y AGD mostró un contenido en ARA de 0,2% confirmando que los requerimientos nutricionales en ARA para esta especie son bajos (tesis doctoral de Villallta (2007)). Estos resultados contrastan con los observados en otras especies donde bajos niveles de ARA tuvieron un efecto negativo sobre la supervivencia y el crecimiento en *Seriola quinqueradiata* (Bransden, 2004), dorada (Bessonart et al., 1999) y bacalao (Zheng et al. (1996),

Finalmente mencionar que no existieron diferencias de supervivencia en función del enriquecedor/emulsión utilizada para enriquecer la *Artemia*, estando los valores comprendidos entre el 20 y 25%. Estos resultados son algo bajos si se comparan con estudios previos con larvas de lenguado durante el mismo período de desarrollo y condiciones experimentales similares (tesis doctoral de Villallta (2007); Fernández et al., 2009) donde la supervivencia ronda entorno al 60-80%. Teniendo en cuenta que las distintas dietas evaluadas en el presente estudio mostraron valores similares en relación a la supervivencia de los animales, sumado al hecho de que no se detectó ningún brote infeccioso que pudiera afectar la viabilidad de las larvas, concluimos que los bajos valores observados de supervivencia en comparación con los de otros trabajos podrían ser achacados a una menor calidad de la puesta que fue utilizada en el presente estudio.

Si bien hasta el momento sólo hemos considerado el posible papel de los HUFAs sobre las diferencias en talla y peso de las larvas de lenguado alimentadas con *Artemia*

enriquecida con distintas emulsiones/enriquecedores comerciales, no es posible omitir el papel que puedan haber jugado otros nutrientes de la dieta, tales como proteínas o vitaminas. En este sentido, los resultados observados no son achacables a distintos niveles de proteína en la dieta, puesto que la *Artemia* enriquecida con distintas emulsiones/enriquecedores comerciales presentó valores de proteína soluble similares en todos los casos (datos no incluidos en la presente memoria), valores que no explicarían las diferencias en talla y peso observadas entre las distintas dietas. Sin embargo, los resultados observados podrían relacionarse con el contenido en vitamina A de las emulsiones/enriquecedores comerciales, y por consiguiente por el contenido en este nutriente de la *Artemia* enriquecida.

La vitamina A ejerce un papel preponderante en diversos procesos biológicos, incluyendo, diferenciación y proliferación celular (Ito y Morita, 1995; Gaemers et al., 1996; Park et al., 1997), resistencia a infecciones, desarrollo embrionario, crecimiento, desarrollo esquelético, visión y establecimiento de la simetría bilateral en los primeros estadios de desarrollo del animal (Olson, 1984; Tacon, 1989; Levin, 1994; Ross et al., 2000; Lall y Lewis – McCrea 2007), y mantenimiento de la salud general de organismos (Combs, 1998; Halver, 2002). Distintos estudios han mostrado que los requerimientos nutricionales en vitamina A para larvas de peces varía según la especie considerada (Fernández et al., 2009). En este sentido, Hernández et al. (2005) demostraron que juveniles de platija japonesa *Paralichthys olivaceus*, necesitan una dieta con un suplemento de vitamina A de aproximadamente  $9.000 \text{ UI Kg}^{-1}$  para su correcto crecimiento, mientras que valores superiores a  $15.000 \text{ UI Kg}^{-1}$  disminuyeron su crecimiento. Efectos similares han sido descritos para la tilapia (Saleh et al., 1995) y para la trucha arco-iris (Hilton, 1983). Por el contrario, no se conocen los requerimientos nutricionales en relación a la citada vitamina en lenguado. Tal y como

indica el fabricante de cada una de las emulsiones/enriquecedores comerciales ensayados en el presente estudio, dichos productos presentan un amplio rango de contenido en Vitamina A, oscilando entre los valores máximos encontrados en las emulsiones ES, ES/2, MG y RP ( $1,5 \cdot 10^6$ , 750.000, 150.000 y 50.000 IU/kg, respectivamente) hasta los valores mínimos de los enriquecedores AGD y AGG (2.200 y 6.380 IU/kg, respectivamente), y por tanto es de esperar que la *Artemia* enriquecida con dichas emulsiones/enriquecedores refleje su contenido en Vitamina A. Los presentes resultados parecen indicar que niveles altos de vitamina A (*Artemia* enriquecida con ES y ES/2) en la dieta redujeron de forma significativa el crecimiento en talla y peso de las larvas, mientras que aquellas larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con valores bajos del citado nutriente (AGG y AGD) mostraron un mejor crecimiento.

A tenor de los presentes resultados podemos concluir que las diferencias en talla y peso de las larvas de lenguado alimentadas con *Artemia* enriquecida con distintas emulsiones/enriquecedores comerciales se deben principalmente a su composición diferencial en los niveles de HUFAs (*e.g.* DHA, EPA, DHA/EPA) y vitamina A.

### 6.3. Metamorfosis

El proceso de metamorfosis en todos los peces, en especial en los peces planos, está controlado por el sistema neuroendocrino de la larva. En él están implicados varios tipos de hormonas como es el caso de las hormonas tiroideas (producidas en el tiroides). En este sentido las hormonas tiroideas como la triiodotironina (T3), tiroxina (T4) y hormona concentradora de melanina (MCH) regulan y controlan los cambios somáticos y pigmentarios que ocurren en la larva durante su metamorfosis a juvenil, momento en el cual el ejemplar adquirirá su fenotipo definitivo (forma plana, migración de uno de los ojos y pigmentación definitiva en la cara ocular y sin pigmentación en la cara ciega). La mayor parte de los estos sistemas endocrinos responde directamente a los niveles de ciertos nutrientes en la dieta por medio de la síntesis y secreción de hormonas que a su vez se hallan regulado a nivel molecular mediante la unión a receptores nucleares específicos. En este trabajo no hemos encontrado ningún efecto en las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con distintos enriquecedores y emulsiones comerciales sobre de metamorfosis, observándose para todas las dietas un mismo patrón metamórfico. Sin embargo, aunque en la tesis doctoral de Villalta (2007) una cantidad similar de ARA en la dieta producía un retraso en la metamorfosis en este estudio, valores de ARA similares no tuvieron ningún efecto sobre este proceso en las larvas de lenguado. Las diferencias básicas entre ambos estudios radican en que Villalta (2005) utilizó emulsiones experimentales en las que básicamente sólo cambiaba el ARA en relación a la composición global del resto de HUFAs y componentes de la dieta, mientras que en nuestro caso se trata de todo lo contrario. Por lo tanto, estos resultados sugieren que no es el ARA por si sólo el HUFA que juega un papel preponderante sobre la metamorfosis, sino la relación que se establece entre este y el resto de HUFAs de la dieta.



### 6.4. Maduración del sistema digestivo

Además de los parámetros analizados anteriormente, se utilizaron como indicadores del estado de condición de las larvas y como indicadores del efecto de las emulsiones sobre su desarrollo fisiológico, los niveles de actividad de varias enzimas digestivas (pancreáticas e intestinales).

En general, la digestión de los peces teleósteos se caracteriza por un conjunto de procesos químicos por los que algunas enzimas especializadas catalizan la ruptura de las moléculas que componen los alimentos en compuestos simples y pequeños para que puedan atravesar las membranas celulares y ser incorporados en los tejidos corporales. Las proteínas son digeridas por la hidrólisis de un grupo de enzimas proteolíticas que se denominan proteasas (p.ej. pepsina, tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, aminopeptidasa) y que actúan rompiendo los enlaces peptídicos. La digestión de las proteínas sufre diversas alteraciones a lo largo del desarrollo larvario (Cahu y Zambonino Infante, 1994). Las larvas al principio del desarrollo no poseen estómago (carecen de digestión ácida), aunque si se ha observado la digestión de las proteínas en el intestino, digestión que tiene lugar a partir de las proteasas alcalinas (*e.g.* tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasas secretadas por el páncreas) y la aminopeptidasa en el borde en cepillo de los enterocitos de la mucosa intestinal. El incremento de la longitud del intestino les permite un mayor tiempo de digestión de las proteínas, compensando la carencia de una digestión ácida.

En lo que respecta a la morfología del sistema digestivo del lenguado, esta especie presenta un estómago pequeño y un intestino largo cuando se compara con la morfología de otras especies de peces planos (De Groot, 1971). El desarrollo del estómago es mucho más tardío que el de otros órganos, una vez que el desarrollo de la

primera glándula gástrica ocurre, aproximadamente, a partir del día 30 (Ribeiro et al., 1999), lo que sugiere que la digestión de esta especie no es esencialmente ácida durante las etapas tempranas de desarrollo, tanto premetamórficas como postmetamórficas (Yúfera y Darías, 2007). Si bien esto no obstaculiza la digestión de las proteínas, ya que la hidrólisis de las proteínas es asegurada por enzimas pancreáticas e intestinales (Cahu y Zambonino Infante, 1994a). Por estas razones, en el presente estudio hemos seleccionado como marcadores de la función digestiva y del estado de maduración del tracto digestivo la tripsina (proteasa alcalina de origen pancreático) y la aminopeptidasa del borde en cepillo de los enterocitos. A parte del anterior enzima pancreático, también se ha procedido a evaluar la actividad de la amilasa y la lipasa. Si bien el primero de los enzimas es un indicador de la maduración de la función digestiva con el desarrollo al disminuir con la edad (*e.g.* a edades similares, valores de amilasa más elevados son indicadores de un retraso en el desarrollo), la actividad de la lipasa pancreática fue cuantificada con el fin de detectar posibles efectos de la dieta (fracción lipídica) sobre la actividad digestiva.

Ha sido demostrado en diversas especies, incluyendo la lubina (Cahu y Zambonino Infante, 1997) y el lenguado senegales (Ribeiro et al., 1999), que la actividad de las enzimas intestinales del borde del cepillo como la fosfatasa alcalina incrementa con la edad de los animales, pudiéndose considerar como un indicador del grado de maduración del intestino. Este aumento va acompañado por el descenso de la leucino-alaninapeptidasa, enzima citosólico lisosomal que se encuentra en los enterocitos que presenta una elevada actividad durante las etapas tempranas del desarrollo antes del pleno desarrollo del borde en cepillo de los enterocitos. La disminución con la edad, de determinadas enzimas pancreáticas como la amilasa e intestinales como la leucino-alaninaptidas y el aumento de las enzimas intestinales

como la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa del borde del cepillo de los enterocitos, es un rasgo característico de una maduración normal en de la función digestiva y del progresivo paso de una digestión de tipo larvario a una de juvenil (Henning, 1987).

A nivel general se observó que los valores de actividad específica de amilasa disminuyeron de forma progresiva a lo largo del experimento independientemente de la dieta suministrada. Sin embargo, los resultados del presente estudio en el que las larvas de lenguado fueron alimentadas con *Artemia* enriquecida con distintas emulsiones/enriquecedores comerciales muestran al final del periodo experimental que las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con AGG presentaron los valores más bajos de actividad específica de amilasa. Como se ha indicado anteriormente, este hecho podría deberse a que las larvas alimentadas con esta dieta tenían un sistema digestivo más avanzado fisiológicamente que las larvas alimentadas con otras dietas, resultados que también estarían de acuerdo con los observados en relación al crecimiento y peso de las larvas. Por el contrario, las larvas alimentadas con la dieta enriquecida con ES presentaron una mayor actividad específica de la amilasa, valores que se correlacionan positivamente con un menor crecimiento de las larvas y serían interpretados con un mayor retraso de la función digestiva. Finalmente mencionar que las larvas alimentadas con la *Artemia* enriquecida con RP, AGD, ES/2, y MG mostraron una actividad específica intermedia de la amilasa, y curiosamente estas mismas larvas manifestaron un crecimiento intermedio.

La lipasa es una enzima pancreática y es bien conocido que dicha enzima cataliza la descomposición de las grasas neutras (triglicéridos), primero en diacilgliceroles y luego en monoacilgliceroles. La lipasa se produce principalmente en el páncreas y es secretada en el intestino donde las sales biliares proceden a su activación. Esto parece que la respuesta directa de la lipasa a su substrato, triglicéridos y

la actividad de esta enzima sugiere una máxima capacidad de síntesis de lipasa triglicéridos en la dieta. Por lo tanto, la regulación de la síntesis de enzimas lipolíticas parece ser eficaz para las larvas, explicando el por qué el crecimiento de la larva depende de los niveles de lípidos en la dieta, si bien la regulación nutricional de las lipasas es mucho más grosera que la observada para la fosfolipasa (Zambonino Infante y Cahu, 2001). En nuestro trabajo, no hemos observado diferencias significativas en la actividad específica de lipasa entre las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con distintas emulsiones/enriquecedores comerciales. Esto podría deberse a que las dietas tenían los mismos niveles de lípidos totales y posiblemente de triglicéridos, aunque éstos no han sido cuantificados directamente. Nuestros resultados son comparables con los conseguidos en varias especies como la *S. senegalensis* (Martínez et al., 1999), *S. ocellatus* (Lazo et al., 2000), *D. sargus* (Cara et al., 2003), *P. erythrinus* (Suzer et al., 2006) y *Seriola lalandi* (Chen et al., 2006).

Las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se utilizan como indicadores de funcionalidad del epitelio intestinal y están relacionadas con los procesos de absorción y transporte a través de la membrana (Smith, 1992; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). En relación con la actividad fosfatasa alcalina, hemos visto que las larvas alimentadas con la dieta enriquecida con AGG mostraban una mayor actividad específica de esta enzima. Estos resultados se podrían correlacionar con los valores de la enzima amilasa y los de crecimiento. Estas larvas alimentadas con esta dieta tenían mayor actividad de enzima de intestinales y menor actividad de enzimas pancreáticas. Esto podría deberse a que estas larvas poseen un sistema digestivo más desarrollado y avanzado que las larvas alimentadas la *Artemia* enriquecida con el resto de emulsiones/enriquecedores considerados. Ambos resultados están correlacionados con un mejor crecimiento. Por el contrario, las larvas alimentadas con la *Artemia*

enriquecida con ES, presentaron una actividad específica de fosfatasa alcalina mucho más baja que el grupo anterior y mayor actividad de la amilasa, indicando estos resultados un menor desarrollo de la función digestiva que también se correlaciona con un menor crecimiento en peso y talla. Al igual que en el caso de la amilasa, las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con ES/2, RP, AGD y MG mostraban una actividad específica intermedia de fosfatasa alcalina.

Según lo mencionado anteriormente y de forma análoga a la fosfatasa alcalina, también cabría esperar un incremento de la enzima aminopeptidasa del borde en cepillo. Sin embargo, al final del experimento no hemos visto diferencias significativas en la actividad específica de la aminopeptidasa entre los distintos grupos experimentales. En este sentido, podríamos decir que la aminopeptidasa no reflejaría tanto el proceso de maduración del sistema digestivo sino que sería un reflejo de las etapas finales de la digestión de la proteína (hidrólisis de cadenas peptídicas de reducido tamaño en el interior de los enterocitos), actividades que serían similares entre grupos experimentales debido a valores similares en los niveles de proteína soluble entre dietas.

La leucino-alaninapeptidasa es una importante enzima proteolítica citosólica intestinal durante las etapas tempranas de desarrollo larvario (Zambonino- Infante y Cahu, 1994). En nuestro trabajo, las larvas alimentadas con la *Artemia* enriquecida con AGG mostraron una menor actividad específica de esta enzima. Estos resultados podrían relacionarse con los mayores valores observados de fosfatasa alcalina y por tanto con un mayor desarrollo del sistema digestivo, resultados que podrían reflejar también un mayor crecimiento. Por el contrario, las larvas alimentadas con la *Artemia* enriquecida con ES presentaron un mayor retraso en el desarrollo de su sistema digestivo, tal y como indican los valores elevados de actividad específica de leucina alaninapeptidasa y los valores bajos de actividad específica de fosfatasa alcalina,

resultados que van asociados a un menor crecimiento de dichas larvas. Finalmente, las larvas alimentadas con las dietas enriquecidas ES/2, RP, AGD y MG mostraron unos niveles intermedios de actividad de leucina-alanina peptidasa que se relacionan positivamente con la de fosfatasa alcalina y crecimiento de dichos grupos experimentales.

La secreción de tripsina se produce en respuesta a la ingesta de alimento, además en el tejido pancreático de las larvas, la mayor cantidad de tripsina se presenta en calidad de tripsinogeno enzimáticamente inactiva. Sin embargo, la mayor parte de la tripsina en el tracto intestinal es enzimáticamente activa, por eso esta enzima es considerada como un indicador de la capacidad digestiva. A lo largo del desarrollo del lenguado, la actividad de la tripsina (enzima pancreática) disminuye (Person, 1993) este hecho está correlacionado con el desarrollo del estómago (aparición de las glándulas gástricas) y consecuente aumento de la actividad de la pepsina (Yúfera et al., 2004), mecanismo mediante el cual la larva/juvenil optimizará la digestión de los compuestos proteicos, sin necesitar de la sola contribución de la tripsina (paso de la digestión básica a una digestión ácida de tipo gástrico). En nuestro trabajo, las larvas alimentadas *Artemia* enriquecida con AGG y AGD presentaron una mayor actividad específica de la enzima tripsina. Este resultado, podría relacionarse con los valores observados de la amilasa. La amilasa es un enzima hidrolasa que tiene la función de digerir los carbohidratos (el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples). La tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Cuando empieza digestión de las proteínas, digestión de los carbohidratos se bajo. Por lo tanto, la actividad de la tripsina incrementa. En este sentido, las larvas alimentadas *Artemia* enriquecida con AGG y AGD, mostraron una mayor actividad específica de esta enzima. Esto podría deberse a

que estas larvas poseen un sistema digestivo más desarrollado y avanzado que las larvas alimentadas con dichas dietas. Por el contrario, las larvas alimentadas las dietas enriquecidas con ES/2, RP y MG presentaron una actividad intermedia en relación a las dietas anteriores. Sin embargo, hemos encontrado una actividad alta de la enzima tripsina en las larvas alimentadas la dieta enriquecida con ES. Por otra parte, las larvas alimentadas con la *Artemia* enriquecida con ES mostraron un actividad alta de la enzima de amilasa y leucino-alanina peptidasa y bajos de fosftasa alcalina, y por tanto una menor función y capacidad digestiva, valores que no se corresponden con actividades específica elevadas de tripsina. De todo ello se desprende que los valores elevados de tripsina en el grupo alimentado con ES no responden al grado de desarrollo de la función digestiva en ese grupo de larvas, sino que dichos valores vendrían determinados por la presencia de algún nutriente o grupo de nutrientes que estimularía de forma diferencial la secreción de tripsina pancreática, a través de la colecistoquinina (CCK), hormona que regula la función gástrica estimulando la producción de ciertas enzimas pancreáticas, o por la presencia de determinados compuestos peptídicos que funcionarían como sustratos específicos para dicho enzima pancreático.

Concluyendo, los resultados de actividad específica de diversos enzimas digestivos, tanto pancreáticos como intestinales, muestran que en función de la dieta suministrada las larvas de lenguado presentaron un mayor o menor desarrollo de la función digestiva, resultados que se correlacionan positivamente con los observados a su crecimiento en talla y peso seco.

### 6.5. Malformaciones esqueléticas

En la actualidad existe un elevado porcentaje de larvas producidas en criaderos comerciales que presentan malformaciones esqueléticas y problemas pigmentarios. Generalmente estas deformidades incluyen diferentes malformaciones esqueléticas tanto a nivel vertebral o espinal, como son la cifosis, lordosis y escoliosis. Las malformaciones pueden ocurrir también a nivel de las mandíbulas, opérculo, aletas y de la migración del ojo. Estas malformaciones afectan al crecimiento, desarrollo (Divanach et al., 1996; Boglione et al., 2001), morfología, apariencia externa y supervivencia de los peces. (Koumoundouros et al., 1997).

En nuestro trabajo, hemos encontrado altos niveles de malformaciones totales entre las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con diferentes emulsiones/enriquecedores comerciales. No hemos encontrado diferencias significativas ni en la incidencia de malformaciones totales, ni tampoco en otras categorías y/o tipologías de malformaciones consideradas. Los niveles encontrados de malformaciones totales fueron los siguientes para cada dieta: ES/2 (75,9%), ES (77,7%), RP (78,8%), AGG (81,8%), AGD (81,9%) y MG (82,6%). Sin embargo, sí hemos encontrado diferencias significativas sobre la incidencia de animales con fusión de cuerpos vertebrales y malformaciones en las espinas hemales y neurales modificadas del complejo caudal, si bien dichos valores fueron muy parecidos entre ellos, y no se pueden extraer conclusiones claras respecto al papel de determinados nutrientes de la dieta sobre la aparición de las citadas anomalías esqueléticas.

Diferentes estudios han demostrado una alta incidencia de deformaciones esqueléticas, especialmente durante las fases tempranas del desarrollo del lenguado senegales, niveles que van desde un 44% (Gavaia et al., 2002) a un 74% (Fernández, et



al., 2009), llegando incluso a alcanzar un 80% (Engrola et al., 2009). Dentro de este contexto, nuestros resultados globales de deformaciones para cada tipo de dieta considerada son comparables a los obtenidos por el resto de trabajos sobre esta especie, y por tanto, se puede decir que no se observaron efectos del tipo de dieta sobre la calidad final de las larvas. Tal y como indica el fabricante de cada una de las emulsiones/enriquecedores comerciales ensayados en el presente estudio, dichos productos presentan un amplio rango de contenido en Vitamina A, oscilando entre los valores máximos encontrados en las emulsiones ES, ES/2, MG y RP ( $1,5 \cdot 10^6$ , 750.000, 150.000 y 50.000 IU/kg, respectivamente) hasta los valores mínimos de los enriquecedores AGD y AGG (2.200 y 6.380 IU/kg, respectivamente).

La elevada incidencia de deformaciones observadas hace pensar que las condiciones de cultivo no son las óptimas para el desarrollo armónico del esqueleto en el lenguado. Entre las causas ambientales más importantes que han sido asociadas a las deformidades esqueléticas están los factores abióticos, xenobióticos, nutricionales y las propias del cultivo intensivo. En este sentido, es posible que las temperaturas a las que se realiza el cultivo larvario del lenguado (18-20°C), si bien son buenas a efectos productivos ya que estimulan un rápido crecimiento de las larvas, pueden no serlo en términos de desarrollo del esqueleto. Así por ejemplo, Galloway *et al.* (1999) manifestó que la temperatura de cultivo produce alteraciones en la ontogenia del esqueleto y del músculo del halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), resultando en deformaciones esqueléticas. Asimismo, Kihara *et al.* (2002) encontró una relación creciente entre la incidencia de la lordosis y la velocidad de corriente, en larvas de dorada japonesa (*Pagrus pagrus*). Slominska y Jezierska (2000) también encontró una relación creciente entre los niveles de metales pesados (cobre y plomo) y la incidencia de la escoliosis o grado de osificación, para carpa común (*Cyprinus carpio*). Teniendo en cuenta estos

resultados, podríamos concluir que la elevada incidencia de deformaciones observadas hace pensar que las condiciones de cultivo en cuanto a temperatura no son las óptimas para el desarrollo armónico del esqueleto en el lenguado, si bien futuros estudios en éste ámbito han de realizarse para poder evaluar la citada hipótesis.

La incidencia de deformaciones esqueléticas reportadas en el lenguado senegalés criados en protocolos de alimentación estándar es mayor que la observada en otras especies, que comúnmente se producen en el área mediterránea, como la dorada (Boglione et al., 2001; Fernandez et al., 2008) o lubina europea (Villeneuve et al., 2005; Mazurais et al., 2008). Dos hipótesis podrían explicar esta alta incidencia de deformidades en el esqueleto del lenguado senegalés observadas en el presente estudio. La primera hipótesis considera que esta especie es más propensa a desarrollar trastornos en el esqueleto que otras especies de peces como la dorada y la lubina, y de aquí los resultados de una mayor incidencia de deformaciones en esta especie en comparación con las otras. La segunda hipótesis postula que, dado que las deformidades esqueléticas observadas en el lenguado senegalés no fueron letales, el mayor número de deformaciones observadas en esta especie se debería a que en otras especies dichas deformaciones fueron letales durante las primeras etapas de vida larvaria y por tanto, no detectables en la etapa juvenil (Divanach et al., 1997; Koumoundouros et al., 1997; Boglione et al., 2001). Dado que ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes la determinación de cuál de los dos modelos explica mejor las observaciones requiere más estudios de desarrollo que permitan identificar los periodos más sensibles de morfogénesis, esqueletogenesis y al desarrollo de deformidades así como el momento de la aparición de las deformidades y su impacto en la supervivencia de las larvas.

## **7. CONCLUSIONES**

## 7. Conclusiones



1. Las larvas reflejó el contenido en HUFAs, y concretamente de DHA, EPA, ARA y DHA/EPA de la *Artemia*.
2. El contenido en HUFAs de la *Artemia* enriquecida con las distintas emulsiones y enriquecedores comerciales afectó al crecimiento durante el periodo experimento estudiado (2-38 dpe). Entre de las emulsiones comerciales, los mejores crecimientos en talla y peso fueron observados en aquellas larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con AGG (DHA = 9.5% TFA, EPA = 3,1% TFA, DHA/ EPA = 3,0). Las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con ES mostraron un peor crecimiento en peso y talla (DHA = 5.5% TFA, EPA = 7,1% TFA, DHA/ EPA = 0,7).
3. Niveles altos de vitamina A (*Artemia* enriquecida con ES -  $1.5 \cdot 10^6$  IU  $\text{kg}^{-1}$  y ES/2 - 750.000 IU  $\text{kg}^{-1}$ ) en la dieta redujeron de forma significativa el crecimiento en talla y peso de las larvas, mientas que aquellas larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con valores bajos del citado nutriente (AGD y AGG; 2.200 y 6.380 IU  $\text{kg}^{-1}$ , respectivamente) mostraron un mejor crecimiento.
4. Las dietas evaluadas no afectaron la supervivencia al final del estudio, si bien los resultados observados son ligeramente inferiores a los esperables, resultados que no vendrían dados por el diseño experimental realizado, sino más bien por un problema de calidad de puesta.
5. El proceso de metamorfosis y pigmentación de las larvas no se vio afectado por las distintas dietas.

6. La funcionalidad y maduración del sistema digestivo de las larvas de lenguado se vio afectado por la dieta suministrada, observándose un mayor desarrollo de la función digestiva en aquellos animales alimentados con *Artemia* enriquecida con AGG y un retraso en dicho proceso en aquellos alimentados con *Artemia* enriquecida con ES.
7. No hubo un efecto dosis-respuesta en función de la dieta suministrada y la incidencia de deformaciones esqueléticas, si bien en todos los grupos se observó una elevada proporción de animales con alguna deformidad esquelética (76-83%). Tampoco se observó ningún efecto de la dieta sobre el número de vértebras.
8. A nivel de la columna vertebral, las deformaciones más importantes encontradas fueron las fusiones y compresiones vertebrales, y las deformaciones en las espinas neurales y hemales. La fusión de las vértebras abdominales fue abundante en aquellos animales alimentados con *Artemia* enriquecida con AGD, mientras que la torsión de la columna vertebral fue observado en aquellas alimentadas con *Artemia* enriquecida con RP y AGD. Casos de escoliosis fueron detectados mayoritariamente en larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con ES, y anomalías de cuerpo vertebral en animales alimentados con *Artemia* enriquecida con ES; AGD y RP. El efecto causante de dichas diferencias no puede ser explicado mediante este trabajo.
9. Del complejo caudal, las deformaciones más importantes se encontraron a nivel de los elementos esqueléticos, hipurales (p.ej. diferentes combinaciones de fusiones entre los 5 elementos hipurales, la presencia de un elemento hipural supranumerario), epurales, espinas neurales modificadas y espinas hemales modificadas, si bien no se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.

**10.** A partir del análisis ponderado de los distintos parámetros analizados en el presente estudio parece alimentar las larvas de lenguado con *Artemia* enriquecida con AquaGrow Gold (Advanced BioNutrition), desaconsejándose enriquecedores debido al alto una de los enriquecedores tipo easy selco es recomendable corroborar estos estudios.

## **8. REFERENCIAS**

- Abellan, E., Basurco, B., 1999. Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. Cah. Option Méditerran. Zaragoza, Spain, 139 pp.
- Anguis V, Cañavate JP, 2005. Spawning of captive *Senegal sole (Solea senegalensis)* under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- APROMAR, 2006. La acuicultura marina de peces en España abril, 2006 (<http://www.apromar.es/Informes/Informe%20APROMAR%202006.pdf>).
- APROMAR, 2009. La acuicultura marina de peces en España julio, 2009 (<http://www.apromar.es/Informes/informe%202009/Informe-APROMAR-2009.pdf>).
- Aragao, C., 1999 The effect of feeding rotifers at first feeding of *Solea senegalensis*. Working report, CCMAR, universidade do Algarve, 4 pp.
- Balfry SK, Maule AG & Iwama GK 2001 Coho salmon *Onchorhynchus kisutch* strain differences in disease resistance and non-specific immunity, following immersion challenges with *Vibrio anguillarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 47 39–48.
- Barnabé, G. 1986. *Aquaculture. Vol II. Technique et Documentation-Lavoisier, France.* 1115 pp.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes, R., Chatain, B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the European seabass, *Dicentrarchus labrax L.*, reared extensively and intensively. *Aquaculture* 99, 339-354.



- Bedoui, R., 1995. Elevage de *Solea senegalensis* ( Kaup, 1958) en Tunisia. Cah. Options méditerr. 16, 31-39.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218, 491-499.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995a. Effects of different dietary arachidonic acid-docosahexaenoic acid ratios on phospholipids fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiol. Biochem. 14, 139-151.
- Bell, M.V., Batty, R.S., Dick, J.R., Fretwell, K., Navarro, J.C., Sargent, J.R., 1995b. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus L.*). Lipids 30, 443-449.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994a. Effects of supplementation with 20: 3 ( n-6), 20: 4 (n-6 ) and 20 :5 (n-3 ) on the production of the prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3- series in turbot (*Scophthalmus maximus L.*) brain astroglial cells in primary culture. Biochim. Biophys. Acta 1211, 335-342.
- Bell JG, Tocher DR, MacDonald FM & Sargent JR 1994b Effects of diets rich in linoleic (18:2n-6) and a-linolenic acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Fish Physiology and Biochemistry 13 105–118.

- Bell JG, Tocher DR, Farndale BM & Sargent JR 1998 Growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid composition, eicosanoid production and response to stress, in juvenile turbot fed diets rich in g-linolenic acid in combination with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58 353–364.
- Bell, M.V., Henderson, R.J., Pirie, B.J.S. and J.R. Sargent, J.R. 1985. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot, *Scophthalmus maximus*, *J. Fish Biol.* **26** (1985), pp. 181–191.
- Ben-Tuvia, A., 1990. A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S.lascaris* *J. Fish Biol.* 36,947-960.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321-329.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Gonzáles, M.M., Fernández-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream ( *Spauro aurata L.*) larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Bisbal, G.A., Bengtson, D.A., 1995. Development of digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.* 47, 277-291.
- Boglione, C., Gagliardi, G., Scardi, M., Cataudella, S., 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata L.* 1758). *Aquaculture* 192, 1-22.

- Baglolle, C.J., Murray, H.M., Goff, G.P., Wright, G.M., 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *J. Fish. Biol.* 51, 120-134.
- Borja J, 1920. Contribución al estudio de la fauna ictiológica de España. *Mem R Acad Cienc Art, Barcelona* 16: 1-191.
- Boulhic., M. and Gabaudan., J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swimbladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758), *Aquaculture* **102** (1992), pp. 373–396.
- Braber L, De Groot SJ, 1973. The food of five flatfish species (Pleuronectiformes) in the southern North Sea. *Neth J Sea Res* 6: 163-172.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandsen, M.P., Cobcroft, J.M., Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Kolkovski, S., 2005. Dietary 22:6n-3 alters gut and liver structure and behavior in larval striped trumpeter (*Latris lineate*), *Aquaculture* 248, 275-285.
- Brandsen, M.P., Dunstan, G.A., Battaglione, S.C., Cobcroft, J.M., Morehead, D.T., Kolkovski, S., Nichols, P.D., 2004. Influences of dietary n-3 long-chain PUFA on body concentrations of 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3 in the larvae of a marine teleost fish Australian waters, the striped trumpeter (*Latris lineate*). *Lipids* 39, 215-222.

- Brinkmeyer, R.L., Holt, G.J., 1998 Highly unsaturated fatty acids in diets for red drum (*Scianops ocellatus*).
- Bromley , P.J. 1979. The weaning of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) and sole ( *Solea solea L.*) on dry diets. En proc. World Symp. On Fish Nutr. And Fish Feed Tech, I, 449-455.
- Bromley, P.J. 1974. The effects of dietary water content on the groth of hatchery-reared turbot (*Scophthalmus maximus L.*) and sole ( *Solea solea L.*). I.C.E.S. C.M. 1974/E: 18:1-5.
- Bromley, P.J. 1977. Methods of weaning juvenile hatchery reared sole (*Solea solea L.*) from live food to prepared diets. Aquaculture 12, 337-347.
- Buchet, V., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L.,1997. Varition in activities of some digestive enzymes during larval development of Sciaenops ocellatus. Island Aquaculture and tropical Aquaculture, Les Trois Ilets, Martinique, F.W.I., pp. 55-56.
- Cabral, H.N., 2000. Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. J. Fish Biol. 57, 1550-1562.
- Cadena Roa, M. 1983. Etude experimentale de L'alimentation de la sole (*Solea vulgaris Q.*) en élevage intensif. Thèse Doctorat 3<sup>o</sup> Cycle. Université de Bretagne Occidentale, Francia, 132 pp.

- Cadena Roa, M., C. Huelvan, Y. Le Borgne & R. Metailler 1982. Use of rehydratable extruded pellets and attractive substances for the weaning of sole (*Solea vulgaris*) Meeting of World Aquaculture Society. Charleston, USA, 28 Feb- 4 Mar 1982.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Int.* 5, 151-160.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213-222.
- Cañavate, J.P., Zerolo, R., Fernández-Díaz, C., 2006. Feeding and development of senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture* 258, 368-377.
- Cañavate, J.P., 2005. Opciones del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) para diversificar la acuicultura marina. Resúmenes del X Congreso Nacional de acuicultura. UPV, 340-347 pp.
- Cañavate JP, Fernandez-Díaz C, 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174: 255-263.
- Carbó, R., Estévez, A., Furones, M.D., 2003. Intelligent and multifunctional recirculation system. Its applicaion in research at CA-IRTA. Spec. Publ.- EAS 32, 171-172.

- Cara, B., Moynao, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol.* 63, 48–58.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128. 315-333.
- Chaouachi B, Ben Hassine OK, 1998. The status of fish biodiversity in Ichkeul Lagoon, Tunisia. *Ital J Zool* 65: 303-304.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G., Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 364-271.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon, Oxford, UK. 207 pp.
- Combs, G.F., 1998. *The vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. 2nd edn. 618 pp. Academic Press, San Diego, California. USA.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A. and Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment, *Aquaculture* **210** (2002), pp. 285–304.

- Cousin, J.C.B and Baudin-Laurencin., F. 1985. Morphogénese de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* L., *Aquaculture* **47** (1985), pp. 305–319.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149-164.
- Cowey, C.B., J.Adron & A.Blair 1970. Studies on the nutrition of marine flatfish: The essential amino acid requirements of plaice and sole. *J.Mar.Biol.Ass. UK*, 50:87-95.
- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Biochim. Biophys. Acta* 554, 264-267.
- Darias, M.J., Lan Chow Wing, O., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L. and Mazurais, D. 2009. Double staining technique set-up for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *J. App. Ichthyol.* Accepted).
- De Groot, S.J., 1971. On the interrelationships between morphology of the alimentary tract, food and feeding behaviour in flatfishes (PISCES: Pleuronectiformes). *Neth. J. Sea Res.* 5, 121–196.
- Dickey-Collas , M. and Geffen, A.J. 1992. Importance of the fatty acids 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae, *Mar. Biol.* **113** (1992), pp. 463–468.

- Dinis, M.T., Soares, F., Ribeiro, L., Engrola, S., Cacão, P., Aragão, C., Pousão-Ferreira, P. and Conceição, L.E.C. (2003) Broodstock management and larval rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). In: Book of Abstracts of the World Aquaculture 03, Salvador, Brazil, 19 May–23 May 2003.
- Dinis, M.T., Ribeiro L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38.
- Dinis MT, Reis J, Arrobas I, 1996. Evaluation of the farming potential for *Solea senegalensis* Kaup, a new species for aquaculture in the Mediterranean area. Book of Abstracts World Aquaculture 96, Bangkok, pp. 107-109.
- Dinis MT, 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to artificial diets. *Aquacult Fish Manag* 23: 515-520.
- Dinis MT, 1986. Quatre Soleidae de l'Estuarie du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'État ès -Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, Brest, Francia .
- Divanach, P., 2003. New species in Mediterranean. Dream or reality? Workshop PROFET Programme, 30th May. Athens, Greece.
- Divanach, P., Boglione C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M., Cataudella, S., 1996. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. In: Chatain, B., Saroglia, M., Sweetman, J., Lavens, P. (Eds.), *Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects*. EAS International Workshop, Verona, Italy, pp. 45-66.



- Divanach et al., 1997 P. Divanach, N. Papandroulakis, P. Anastasiadis, G. Koumoundouros and M. Kentouri, Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with functional swim bladder during post larval and nursery phase, *Aquaculture* **156** (1997), pp. 145–155
- Drake, P., Arias, A.M. and Rodriguez, A., 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cadiz): II. Características de la producción de peces. *Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq.* 116, 1–23.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L.E.C., Gavaia, P.J., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 2009. Cofeeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288, 264-227.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed liveprey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180, 321-343.
- Estevez, A., Izhikawa, M. & Kanazawa, A. 1997. Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralychthys olivaceous* (temmink and Sclegel ).*Aquaculture, Res*, 28, 279-289.
- FAO, 2008 El estado mundial de la pesca y la acuicultura, ISBN 978-92-5-306029-0 Roma (<http://www.fao.org/docrep/011/i0250s/i0250s00.HTM> ).
- FAO, 2006 El estado mundial de la pesca y la acuicultura, ISBN 978-92-5-305568-5 Roma (<http://www.fao.org/docrep/009/a0699s/a0699s00.htm> ).

- Fernández, I., Pimentel, M.S., Ortiz-Delgado, J.B., Hontoria, F., Saraquete, C., Estevez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., 2009 Effect of dietary vitamin A on Senegale sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 295, 250-265.
- Fernández, I., Hontaria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 283:102-115.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J.P., Moyano, F.J., Alorcón, F.J., Díaz, M., 2001 Growth and physiological changes during metamorphosis of *Senegal sole* reared in the laboratory. *J. Fish Biol.* 58, 1086-1097.
- Fishbase, 2010. Comunicación Internet.
- <http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=8852>
- Flos R, Reig L, Fernandez JV, Ambrosio PP, Carbó R, 1995. Ensayos preliminares para el cultivo intensivo de lenguado. En: "Proc V Congr Nal Acuicultura". Castelló F, Calderer A (Eds.), Barcelona, pp. 839-844.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fontagné, S., Bazin, D., Bréque, J., Vachot, C., Bernarde, C., Roualt, T., Bergot, P. 2006. Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. *Aquaculture* 257:400-411.

- Fuchs, J. 1982a .Production de juveniles de sole (*Solea solea*) en conditions intensives.  
I. Le premier mois d'élevage. Aquaculture, 26:321-337.
- Fuchs, J. 1982b Production de juveniles de sole (*Solea solea*) en conditions intensives.  
II. Techniques de sevrage entre 1 et 3 mois. Aquaculture, 26:359-358.
- Fuchs, J., 1978. Effect of photoperiod on growth and survival during rearing of larvae and juveniles of sole ( *Solea solea* L.). Aquaculture 15, 63-74.
- Furita, H., Takeuchi, T., Uematsu, K., 1998. Effects of eicoapentaenoic and docohexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder ( *Paralichthys olivaceus* ). Aquaculture 161, 269-279.
- Furita, H., Takeuchi, T., Watanabe, T., Fujimoto, H., Sekiya, S., imaizumi, k. 1996. Requirement of larval yellowtail for ecosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and n-3 highly unsaturated fatty acid. Fisheries Science. 62: 372 – 379.
- Gaemers, I.C., van pelt, A.M.M, van der saag, P.T., de Rooij, D.G., 1996. All-*trans*-4-oxo-retinoic acid: a potent inducer of in vivo proliferation of growth-arrested A spermatogonia in the vitamin A- deficient mouse testi. Endocrinology 137, 479-485.
- Galloway, T.F., Kjorsvik, E. y Kryvi H. 1999. Muscle growth in yolk sac larvae of the Atlantic halibut as influenced by temperature in the eggs and yolk-sac stage. J. Fish Biol. 55: 26-43.

- Ganga R, Bell JG, Montero D, Robaina L, Caballero MJ & Izquierdo MS 2005 Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 142 410–418.
- García-López A, Anguis V, Couto E, Canario AVM, Cañavate JP, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, 2006a. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture* 254: 583-593.
- García-López A, Fernández-Pasquier V, Couto E, Canario AVM, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, 2006b. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *Gen Comp Endocrinol* 147: 343-351.
- Gavaia, P.J., Dinis, M.T., Cancela, M.L., 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211, 305-32.
- Girin, M., R. Metailler & J. Nedelec 1977. Accoutumance de jeunes soles (*Solea solea*) a diffrents aliments inertes apres achevement de la metamorphose. Actes de Colloque du C.N.E.X.O., 4:35-50.
- Gisbert, E., Fernández,I., & Estévez, A.2008. Nutrición y Morfogénesis: Efecto de la Dieta Sobre la calidad larvaria en peces.IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre.Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey,Nuevo León,México, 46-78 pp.

- Guerden, I., Charlon, N., Marion, D. and Bergot, P. 1995a. Dietary phospholipids and body deformities in carp (*Cyprinus carpio L.*) larvae. In: Larvi 95'. pp: 162-165. Edited by P. Lavens, E.Jaspers and I. Roelants. EAS Special Publication No. 24. Gent, Belgium.
- Guerden, I., Radunz-Neto, J. and Bergot, P. 1995b. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio L.*) larvae. *Aquaculture* 131:303-314.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R., 2002. *Nutrición y Alimentación de peces y Crustáceos*. Ediciones Mundi-Prensa, 475 pp.
- Goucha M, Ktari MH, 1981. Présence de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 sur les côtes nord de la Tunisie. *Rapp Comm int Mer Médit* 27: 131-133.
- Halver, J. E., 2002. The vitamins In: *Fish nutrition*. 3rd edn. (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds), pp. 61-141. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA.
- Henning, S.J., 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. In: Johnson, J.R. (Ed.), *Physiology of gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York,
- Hernandez, H.L.H., Teshima, S.I., Ishikawa, M., Alam, S., Koshio, S., 2005. Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutr.* 11, 3-9. pp. 285-300.
- Hilton, J.W., 1983. Hypervitaminosis A in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): toxicity signs and maximum tolerable level. *J. Nutr.* 113, 1737-1745.

- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A. and Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.*, 118, 515-520.
- Hong S, Tjonahen E, Morgan EL, Lu Y, Serhan CN & Rowley AF 2005 Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins—mediator lipidomic analysis. *Prostaglandins, other lipid mediators* 78 107–116.
- Horrobin DF 1983 The regulation of prostaglandin biosynthesis by the manipulation of essential fatty acid metabolism. *Revision of Pure Applied Science* 4 339–383.
- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 355-36.
- Howell, B.R., & Tzoumas, T.S. 1991. The nutritional value of *Artemia* nauplii for larval sole, *Solea solea* (L.), with respect to their (n-3) HUFA content. In: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier, Editors, Larvi '91—Fish and Crustacean Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special Publication vol. 15, Gent, Belgium (1991), pp. 63–65.
- Howell, B.R., 1979. Experiments on the rearing of larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 18, 215-225.
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile-salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59–69.

- Ito, K. y Morita, T., 1995. Role of retinoic acid in mouse neural crest cell-development in vitro. *Dev. Dyn.* 204, 211-218.
- Izquierdo, M.S., 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species *Cah.options Mediterr.* 63, 91-102.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L.& Hernández-Cruz, C.M. 2000 Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol Biochem* 22, 97-107.
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acids requirements of cultured marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 4, 183-191.
- Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeuchi, T., Haroun, R. and Watanabe, T. 1992 Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture* **105** (1992), pp. 73–82.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C. 1989. Requirement of larval seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55: 859 – 867.
- JACUMAR, 2006 La Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, noviembre 2006  
( [http://www.mapa.es/eu/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura\\_es.htm](http://www.mapa.es/eu/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura_es.htm) ).
- JACUMAR, 2009 La Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, noviembre 2009,  
(<http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/presentacion.htm> ).

- Kacem, A., Meunier, J.F., Aubin, J. & Haffray, P. 2004. Caractérisation Histo-Morphologique des malformations du squelette vertébral chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) après différents traitements de triploidisation, France, Cybium 2004, 28 (1) 15-23.
- Kanazawa, A. 1993. Nutritional mechanism involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery reared flounder. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 162-166.
- Kanazawa A., Teshima S., Inamori S., Iwashita T., Nagao A. 1981. Effect of phospholipids on survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Uni.* 30, 301-309.
- Kihara, M., Ogata, S., Kawano, N., Kubota, I. y Yamaguchi, R. 2002. Lordosis induction in juvenile red sea bream *Pagrus major* by high swimming activity. *Aquaculture*, 212: 149-158.
- Kjørsvik., E. and A.L. Reiersen., A.L. 1992. Histomorphology of the early yolk-sac larvae of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)—An indication of the timing of functionality, *J. Fish Biol.* **41** (1992), pp. 1–19.
- Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M., 1997. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149, 215–226.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. Wm., Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 13, 275-283.



- Lagardère, F., Decamps, P., Quero, J.C., 1979 Découverte le long des cotes de la charente maritime d'une population de *Solea senegalensis* Kaup 1858 (Soleidae, Pleuronectiformes). Ann.Soc.Sci.Nat.Charente Maritime 6, 563-572.
- Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish- An overview. Aquaculture 267: 3-19.
- Lazo, J.P., Holt, G.J., Arnold, C.R., 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquacult. Nutr. 6, 183–192.
- Léger, P., Bengston, D.A. & Simpson, K.L. 1986 The use and nutritional value of *Artemia* as a food source, Oceanogr. Mar.Biol.ann.Rev.24, 521-623.
- Levin, M.S., 1994. Intestinal absorption and metabolism of vitamin A. Physiol. Gast. Tract. 3rd, 59.
- Lewis, L.M., Lall, S.P., and Witten, P.E., 2004. Morphological description of the early stages of spine and vertebral development in hatchery-reared larval and juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), *Aquaculture* **241** (2004), pp. 47–59.
- Ling, S.W., 1977. Aquaculture in Southeast Asia: A historical Overview. Washington Sea Grant Publication (Univ. of Washington Press.), pp. 94-96.
- M.A.P.A., 1984 Ministerion de Agricultura, Pesca y Alimentación 23/1984 de 25 de junio.
- Mackie, A.M. & A.I. Mitchell, 1985 Identification of gustatory feeding stimulants for fish- aplications in aquaculture. In Nutrition and Feeding in Fish, edited by C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell. Academic Press, London, pp. 177–190.

- Mackie, A.M. 1982. Identification of gustatory feeding stimulants. En: HARA, T.J.(ed.) Chemorreception in fishes. Elsevier Science Publ. Co. Amsterdam : 275-291.
- Mackie, A.M., J.W. Adron & P.T. Grant, 1980. Chemical nature of feeding stimulants for juvenile Dover sole, *Solea solea*. *J. Fish Biol.* 16 (1980), pp. 701–708.
- Mackie, A.M. & J.W. Adron 1978. Identification of inosine and inosine 5`-monophosphate as the gustatory feeding stimulants for the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 60 A: 79-83.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282-295.
- Martínez, I., Moyano, F. J., Fernández-Díaz, C. and Yúfera, M. (1999). Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 21, 317–323.
- Matsumoto H, Iijima N & Kayama M 1989 The prostaglandin synthesis in marine fish thrombocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 93B 397–402.
- Mazurais, D., Darias, M:J., Gouillou-Coustans, M.F., Le Gall, M.M., Huelvan, C., Desbruyères, E., Quazuguel, P., Cahu, C., and Zambonino-Infante, J.L. (2008) . Dietary vitamin mix levels influence the ossification process in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (2008), pp. 520–527.

- McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B., Sargent, J.R. 1998. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic acid and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Bull. Aquacul.Soc.Canada 98-417-20.
- Metailler, R., Cadena-Roa, M., Person -le Ruyet, J., 1983. Attractive chemical substances for the weaning of Dover sole (*Solea vulgaris*): qualitative and quantitative approach. J.World Maricult. Soc. 14,679-684.
- Metailler, R. & M. Girin 1976. Croissance de jeunes soles (*Solea solea*) nées en laboratoire et conditionnées à l'aliment composé. ICES, 2nd Meeting of the Working Group on Mariculture, Hamburg, 4-6 May 1976.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l'α-amylase par une microtechnique. Ann. Biol. Clin. 26, 133-142.
- Monroig, O., 2006. Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis Doctoral, Universitat de València.
- Montero D, Tort L, Robaina L, Vergara JM & Izquierdo MS 2001 Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Fish and Shellfish Immunology 11 473-490.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Díaz-Salvago, E, Grau, A., Pastor, E., 1999 Study of the n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* larvae at the Artemia feeding stage. Aquaculture 179, 291-307.

- Mourete , G., Vazquez, R., 1996 Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup, Fish Physiol. Biochem. 15, 221-235.
- Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, C., 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiol. Biochem.15, 121-130.
- Morais, S., Caballero, M.J., Conceição, L.E.C., Izquierdo, M.S., and Dinis, M.T. 2006 Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity, *Comp. Biochem. Physiol.* 144B (2006), pp. 57–69.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2005a. Dietary protein: lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a telost larva. *Br. J. Nutr.* 93, 1-9.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2005b. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senagalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 246, 347-357.
- Morais, S., Narciso, L., Dores, L., and P. Pousao-Ferreira, 2004. Lipid enrichment for Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on growth, survival and fatty acid profile, *Aquac. Int.* 12 pp. 281–298.

- Morais, S., Lacuisse, M., Conceicao, L.E.C, Dinis, M.T., Ronnestad, I., 2004a. Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. *Mar. Biol.* 145, 243-250.
- Morais, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T. & Rønnestad, I., 2004b A method for radiolabeling *Artemia* with applications in studies of food intake, digestibility, protein and amino acid metabolism in larval fish, *Aquaculture* 231 (2004), pp. 469–487.
- Morais, S., Narciso, L., Dores, E., Pousão-Ferreira, P., 2004c, Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile, *Aquac. Int.* 12 (2004), pp. 281–298.
- Morinière P., 1983. Étude de la croissance de la sole (*Solea vulgaris* Q.) en élevage intensif. Thèse 3e cycle. Université de Bretagne Occidentale, 80 p.
- Mustafa T & Srivastava KC 1989 Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Advance Comparative Environmental Physiology* 5 157–207.
- Nablone G, Grynberg A, Chevalier A, Leonardi J, Termine E & Lafont H 1990 phospholipase A activity of cultures rat ventricular myocytes is affected by the nature of cellular polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 25 301–306.

- Naas, K.E., Nress, T., Harboe, T., 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture* 105, 143-156.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155-166.
- Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1975. A one-step l-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63, 110–117..
- Olmedo M, Peleteiro JB, Cal R, Linares F, 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en Galicia. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 383– 385
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., Pedersen, T., 1991. The influence of dietary lipid classes in the fatty acid composition of small cod *Gadus morhua* L. juveniles reared in an enclosure in northern Norway. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 148, 59-76.
- Olson, J.A. 1984. Vitamin A. In: Machlin, L. (Ed.), *The Handbook of Vitamins*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 1 - 43.
- Padrós F, Zarza C, Estévez A, Crespo S, Furones MD, 2003. La patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 345-346.
- Park, C.K., Ishimi, Y., Ohmura, M., Yamaguchi, M., Ikegami, S., 1997. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43, 281-296.

- Person Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L., Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live preys? *J. World Aquacult. Soc.* 24, 211-224.
- Person-Le Ruyet J., 1986. L`elevage des poissons plats: sole, turbot. In: Barnabé G. (ed), *Aquaculture*, Lavoiser, Paris, pp. 667-711.
- Person-Le Ruyet, J., et al., 1983 Use of expanded pellets supplemented with attractive chemical substances for the weaning of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. World Maricult. Soc.*, 14:676–678.
- Porta J, 2006. Desarrollo de microsátélites y su aplicación al cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- Pousão-Ferreira, P., Cairrao, F., Nery, F., Narciso, L., 1997. El perfil de los ácidos grasos de larvas de *Sparus aurata* se correlaciona con la composición de dietas de enriquecimiento de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. *Ciencias Marinas* 1997, 23 (1): 83-92, Portugal.
- Quignard JP, Bourquard C, Shehata S, 1986. Note faunistique concernant les Soleidae du Golfe du Lion. (Pisces, Soleidae). *Vie et Milieu* 36: 141-143.
- Rainuzzo, J.R., Reitan , K.I., Jorgensen, L., Olsen, Y., 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 699-710.
- Reitan, K.I., Rainuzzo. J.R., Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae, *Aquacult. Int.*, 2 :33-48.

- Ribeiro, L., Couto, A., Olmedo, M., Álvarez-Blázquez, B., Lineares, F., Valente, L., 2005. Digestive enzymes activity during black spot seabream larvae and post-larvae development. In: Hendry, C.I., Van Stappen, G., Willie, M., Sorgeloos, P (Eds.), Larvi'05-Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, vol. 36. Oostende, Belgium, pp.426-429.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 61-69.
- Ribeiro, L., C. Sarasquete, C. and Dinis, M.T. 1999a Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae, *Aquaculture* 171 , pp. 293–308.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., 1999b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 19, 465-473.
- Rodríguez JL, Souto BF, 2003. Engorde del lenguado Senegalés (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) en Galicia con temperatura controlada. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 407– 409.
- Rodríguez, C., Perez, J.A., Badia, P., Izquierdo, M.S., Palacios, F.H., Hernandez, L., 1998 The  $n-3$  highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet, *Aquaculture*, 169, 9-23.



- Rodriguez A, Rodriguez RB, 1980. Primera cita en el Mediterraneo de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Heterosoma, Soleidae). Invest Pesq 44: 291-295.
- Ross, S.A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., Luca, L. M., 2000. Retinoids in Embryonal Development. *Physiol. Rev.* 80.
- Sá, R., Bexiga, C., Vieira, L., Veiga, P., Erzini, K., 2003. Diets of the sole *Solea vulgaris* Quensel, 1806 and *Solea senegalensis* Kaup, 1858 in the lower estuary of the Guadiana River (Algarve, southern Portugal): Preliminary results. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 19, 505-508.
- Saleh, G.; Eleraku, W.; Gropp, J.M. 1995 A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) *Journal of Applied Ichthyology*, v.11, p.382-385.
- Salhi, M., Kolkovski, S., Izquierdo, M.S., & Tandler, A. 1995. Inclusion of lecithin and polar or neutral lipids high in n-3 HUFA in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. In: *Larvi`95*. (Ed.by P. Lavens, E.jaspers & I. Roelants).pp.184-187.EAS Special publication No.24.Gent.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130, 70-92.
- Sargent J, McEvoy L, Estévez A, Bell G, Bell M, Henderson J, Tocher D, 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217-229.
- Sargent JR (1997). Fish oils and human diet. *Br. J. Nutr.* 78: S5-S13.

- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Tocher. 1993 Docosaehaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. pp. 139 – 149. In C.A. Drevon, I. Baksaas and H.E. Krokan (Eds.), *Omega 3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Sargent, J.R., 1989 Ether-linked glycerides in marine animals. En: Ackman, R.G. (Ed.), *Marine Biogenic Lipids. Fats and Oils*. Bacon Raton, Florida: CRC press, pp. 175-179.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. En: Halver, J.E. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 153-218.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. and Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*, *Mar. Biol.* **119** (1994), pp. 471–486.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., Sargent, J., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in term of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *J. Nutr.* 129, 1186-1194.
- Slominska, I. y Jezierska, B. 2000. The effect of heavy metals on postembryonic development of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Arch. Ryb. Pol.* Vol 8, 1: 119-128.

- Smith, M. V. 1992. Diets effects on enterocyte development Proceedings of the nutrition Society 51: 173-178.
- Soares F, Engrola S, Dinis MT, 2001. Anomalías en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). Bol Inst Esp Oceanogr 18: 405-408.
- Suzer, C., Firat, K., and Saka, Ş. 2006 Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. larvae, *Aquac. Res.* 37, pp. 1565–1571.
- Tacon A.G.J. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación – OEA. Brasilia, Brasil.
- Takeuchi, T., Arakawa, T., Satoh, S., Watanabe, T. 1992. Supplemental effect of phospholipids and requirement of eicosapentaenoico acid and docosahexaenoic acid of juvenile Striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 58: 707 – 713.
- Takeuchi, T., Masuda, R., Ishisaki, Y. 1996. Determination of the requeriment of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriche *Artemia Nauplii*. *Fish. Sci.* 62: 760 – 765.
- Tamura, C.S., Lee, C.S & Ako, H. 1991 Improving the larval rearing of striped mullet, *Mugil cephalus*, by manipulating quantity and quality of rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: Rotifer and microalg culture systems, Proc. Of US-Asia Workshop pp.89-103. Oceanic Inst., Honolulu.

- Tocher DR & Sargent JR 1987 The effects of calcium ionophore A23187 on the metabolism of arachidonic and eicosapentaenoic acids in neutrophils a marine teleost fish rich in (n-3) polyunsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87B 733–739.
- Tocher DR 1995. Glycerophospholipid metabolism. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4, Metabolic and Adaptational Biochemistry, pp 119–1957. Eds W Hochachka & TP Mommsen. Amsterdam:Elsevier Press.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.* 11(2), 107-184.
- Uhing RJ, Cowlen MS & Adams DO 1990 Mechanisms regulating the production of arachidonate metabolites in mononuclear phagocytes. *Current Topics in Membranes Transport* 35 349–374.
- Vázquez, R., González, S., Rodríguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119, 273-286.
- Villalta, M., 2007. Requerimientos en ácidos grasos esenciales y organogénesis de la larva del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària.
- Villalta, M., Estévez, A., 2005 Culture of *Senegal sole* larvae without the need for rotifers. *Aquac. Int.* 13, 469-478.

- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G., 2005b The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period. *Aquaculture* 249, 353-365.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., 2005a Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193-209.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Moriceau, J., Cahu, C.L., Zambonino, J.L. 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Br. J. Nutr.* 95: 677-687.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Cahu, C. L., Le Delliou H., Zambonino Infante, J., 2005. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.* 93, 791-808.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Zambonino, J.L., Quazuguel, P., Cahu, C.L. 2005b. Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. *Br. J. Nutr.* 94:877-884.
- Vizcaíno- Ochoa, V., Lazo, J.P., Benjamin, B.S., Drawbridge, M.A, 2010. The effect of dietary docosahexaenoic acid ( DHA) on growth, survival and pigmentation of California Halibut *Paralichthys californicus* larvae ( Ayres, 1810), *Aquaculture* 302, 228-234.

- Vu, T.T. 1983. Étude histoenzymologique des activités proteasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, *Dicentrarchus labrax* (L.), *Aquaculture* **32** (1983), pp. 57–69.
- Yúfera, M., Darías, M.J., 2007. Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **267**, 94-99.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Vidaurreta, A., Cara, J.B. and F.J. Moyano, F.J. 2004. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei), *Mar. Biol.* **144** (2004), pp. 863–869.
- Watanabe, T., Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* **124**: 223 – 251.
- Watanabe, T. 1988. Nutrition and growth. In: J. Shepherd and N. Bromage (eds), *Intensive Fish Farming*, pp. 154-165.
- Watanabe, T. 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds), *Nutrición en Acuicultura II*. CAYT, Madrid, pp. 99-165.
- Zambonino –Infante, J.L., Cahu, C., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. biochem.physiol.* **130C**, 477-487.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1994 Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **12**, 399-408.

Zarza C, Padrós F, Estévez A, Crespo S, Furones MD, 2003. New fish species for Aquaculture, old pathological problems: the case of *Solea sp.* Proc 11th European Assoc Fish Pathologist, St Julians, Malta.

Zheng, F., Takeuchi, T., Yosheda, K., Kobayashi, M., Hirokawa, J., Watanabe, T., 1996. Requirement of larval cod for arachidonic acid. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using by their enriched *Artemia* nauplii. Nippon Suisan Gakkaishi 62, 669-676, in Japanese.